

Über die Wirkung
verschiedener Antimetabolite und Photoperioden
auf Blütenbildung und Proteinsynthese
der Langtagpflanze *Hyoscyamus niger* L.

SIEGFRIED KLAUTKE

1972

**Über die Wirkung
verschiedener Antimetabolite und Photoperioden
auf Blütenbildung und Proteinsynthese
der Langtagpflanze *Hyoscyamus niger* L.**

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München**

**vorgelegt
von
Siegfried Klautke
aus
München**

November 1971



1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rau

2. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Kandler

Tag der mündlichen Prüfung: 9. 2. 1972

INHALTSVERZEICHNIS

A. Einleitung	1
B. Material und Methode	7
I. Pflanzenmaterial und Anzucht	7
II. Blütenbildung	8
III. Atmungsmessungen	10
IV. Proteinsynthese	10
1. Bedingungen für die Versuchspflanzen	11
2. Messung der Proteinneusynthese durch L-Leucin-1- ¹⁴ C-Markierung	12
3. Extraktion und quantitative Bestimmung des Gesamtproteins	13
4. Messung der Radioaktivität	15
5. Fraktionierung der Proteine	17
V. Verwendete Substanzen	19
C. Ergebnisse	22
I. Induktion der Blütenbildung	22
1. Prüfung der photoperiodischen Empfindlichkeit von <i>Hyposcyamus niger</i>	22
2. Behandlung der Pflanzen mit Cycloheximid (CH)	23
a) Infiltration von CH in die Blätter unter KT-Bedingungen	24
b) Applikation von CH auf den Vegetationspunkt	28
c) Simultane Behandlung des Vegetationspunktes und der Blätter mit CH	29
d) Additive Wirkung von CH-Infiltration und DL	31
e) Additive Wirkung von CH- und 2-TU-Infiltration	32
f) Mehrmalige Infiltration von CH	34
g) Infiltration eines Teiles der Blätter mit CH	36

3. Atmung der Blätter unter verschiedenen induktiven Bedingungen	38
a) Atmung der Blätter von H. n. nach Infiltration mit CH	39
b) Atmung der Blätter von Phaseolus multiflorus nach Infiltration mit CH	43
c) Atmung der Blätter von H. n. unter verschiedenen photoperiodischen Bedingungen	45
4. Die Wirkung weiterer Antimetabolite auf die Blütenbildung von H. n.	47
a) Die Wirkung von Chloramphenicol (CAP)	47
b) Die Wirkung von Puromycin	50
II. Proteinsynthese	51
1. Bilanz des Proteingehalts und des ^{14}C -Leucin-Einbaus	51
a) Verhältnis von Strukturproteinen zu löslichen Proteinen	51
b) Jahresgang des löslichen Proteingehalts	52
c) Bilanz der Radioaktivitätsverteilung bei ^{14}C -Leucin-Zufuhr	53
d) Prüfung der Verteilung der Radioaktivität durch Autoradiographie	55
2. Die Wirkung von Cycloheximid auf die Synthese löslicher Proteine	56
a) CH in isolierte Blätter	56
b) CH in an der Pflanze reagierende Blätter	63
3. Die Wirkung von 2-Thiouracil auf die Synthese löslicher Proteine	64
a) 2-TU in isolierte Blätter	65
b) 2-TU in an der Pflanze reagierende Blätter	68
4. Die Wirkung von Chloramphenicol auf die Synthese löslicher Proteine	70
a) CAP in isolierte Blätter	70
b) CAP in an der Pflanze reagierende Blätter	71

5. Die Wirkung verschiedener Photoperioden auf die Synthese löslicher Proteine	72
a) Verschiedene Photoperioden bei isolierten Blättern	72
b) Verschiedene Photoperioden bei an der Pflanze reagierenden Blättern	75
6. Fraktionierung der löslichen Blattproteine	77
a) Auftrennung in lösliche und ribosomale Proteine durch Ultrazentrifugation	77
b) Fraktionierung durch Ammoniumsulfatfällung	78
c) Trennung nach Molekulargröße – Gelfiltration mit Sephadex G 200	79
D. Diskussion	85
E. Zusammenfassung	95
F. Literaturverzeichnis	98

Verwendete Abkürzungen

H. n.	<i>Hyoscyamus niger</i>
KT	Kurztage
KTP	Kurztagepflanze
LT	Langtag (16 Stunden Licht pro Tag)
LTP	Langtagpflanze
DL	Dauerlicht
DLT	Tage Dauerlicht
SL	Störlicht (KT + Zusatzlichtperiode)
DR	Dunkelrotes Licht ($\lambda = 730 \text{ nm}$)
HR	Hellrotes Licht ($\lambda = 660 \text{ nm}$)
CH	Cycloheximid (Actidion)
2-TU	2-Thiouracil
5-FU	5-Fluoruracil
BU	Bromuracil
CAP	Chloramphenicol
CCC	2-Chloroethyltrimethylammoniumchlorid
TCA	Trichloressigsäure
RQ	Respiratorischer Quotient
PPO	2,5 Diphenyloxazol
POPOP	1,4- Bis 2-(5-Phenyloxazolyl)-Benzol
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
DCMU	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-Dimethyl-Harnstoff
dpm	Zerfälle pro Minute
lpm	Impulse pro Minute
Imp	Impulse
P _{DR}	DR-Pigment (des Phytochroms)
m	molar

A. EINLEITUNG

Bei vielen Pflanzen wird der Übergang von der vegetativen zur generativen Entwicklungsphase durch die Tageslänge bestimmt. Eindeutig wurde diese Erscheinung zuerst von TOURNOIS (1912) beschrieben. Acht Jahre später blieb es dann GARNER u. ALLARD vorbehalten, für die Steuerung von lichtinduzierten Entwicklungsvorgängen bei Organismen in Abhängigkeit von der relativen Tag- oder Nachtlänge den Begriff *Photoperiodismus* einzuführen. Sie waren es auch, die 1923 die beiden sich photoperiodisch gegensätzlich verhaltenden Haupttypen Langtag(LT)- und Kurztag(KT)-Pflanzen erkannten. Im Laufe der Zeit wurden noch andere photoperiodisch reagierende Typen gefunden, z. B. KT-LT-Pflanzen, LT-KT-Pflanzen, aber fast alle lassen sich grundsätzlich auf die oben genannten beiden Hauptgruppen zurückführen. Einige andere Entwicklungsvorgänge stellten sich später ebenfalls als photoperiodisch gesteuert heraus, und zwar sowohl im Pflanzen- als auch im Tierreich, so u. a. der Blattfall im Herbst bei Laubbäumen (Zusammenfassung BÜNNING 1961) oder die Oviparie bei einigen viviparen Insekten (LEES 1966) sowie die Keimdrüsentätigkeit einiger Vögel, um nur einige Beispiele zu nennen.

Die Wirkung des Lichts auf die Blütenbildung hatte SACHS schon in der Mitte des vorigen Jahrhunderts untersucht (Veröffentlichungen 1863–1865). Er schloß aus seinen Versuchen, daß die Induktion der Blütenbildung in den Blättern der Pflanze stattfinden muß und postulierte eine blütenbildende Substanz, die als Transportform den Stimulus zum Vegetationskegel überträgt. Seine Ergebnisse wurden von KNOTT (1934) insofern erweitert, als dieser zeigen konnte, daß sowohl für Kurztagpflanzen (KTP) als auch für Langtagpflanzen (LTP) zur optimalen Auslösung der Blütenbildung einzig und allein die Blätter der Pflanze den induktiven Tageslängen ausgesetzt werden müssen; der Vegetationskegel ist in dieser Phase noch nicht beteiligt. Der in den Blättern ausgelöste Impuls muß demnach zum Vegetationspunkt geleitet werden, wo dann die Umsteuerung von vegetativen zu generativen Blättern stattfindet.

Aus diesem Grunde forderten CHAILAKHYAN (zuletzt 1968) und MELCHERS, aber auch KUIJPER u. WIERSUM (1936) sowie MOSHKOV (1936) und PSAREV (1936) die Existenz eines „Blühhormons“, das in den Blättern produziert wird, dann zum Vegetationspunkt gelangt und dort die Differenzierungsprozesse zur Anlage von Blüten einleitet. Zwar sprechen viele Ergebnisse für diese These, der endgültige Beweis für die Existenz eines solchen Stoffes konnte jedoch bis heute nicht erbracht werden.

Die bisherigen Versuchsergebnisse zum Photoperiodismus und deren Interpretationen lassen sich etwas vereinfacht in vier Komplexe gliedern:

- (1) Es gibt einen Blühstimulus, der sowohl bei LTP als auch bei KTP die gleiche Induktionswirkung hat – wenigstens bei nahe verwandten Gattungen. Beweise dafür liefern zahlreiche Pfropfungsversuche aus dem Arbeitskreis von MELCHERS u. LANG (Zusammenfassung bei LANG 1965), bei denen induzierte Blätter von KTP nach Pfropfung auf LTP Blütenbildung auslösten; ZEEVAART (1958) hatte gleichlautende Ergebnisse erhalten.

Versuche zur Isolierung des „Blühhormons“ mit anschließendem Biotest waren nur teilweise erfolgreich. So berichteten LINCOLN, MAYFIELD a. CUNNINGHAM 1961 von der Präparation eines Extrakts aus blühenden Pflanzen von *Xanthium pennsylvanicum*, der bei nichtinduzierten Exemplaren in einigen Fällen zur Blütenbildung führte; im Jahre 1970 veröffentlichten HODSON a. HAMNER, daß der von blühenden Xanthiumpflanzen (KTP) gewonnene Acetonextrakt bei vegetativen Pflanzen von *Lemna gibba* (LTP) eine Blühdauer von 76 % initiierte und bei vegetativ gehaltenen Xanthiumexemplaren einen Blüherfolg von ca. 50 % auslöste – bei letzteren allerdings nur bei gleichzeitiger Zugabe von Gibberellinsäure, während der Extrakt von vegetativen Pflanzen plus Gibberellinsäure keine Blütenbildung ergab. Frühere Versuche gleicher Art von BISWAS et al. (1966) sowie MUKHERJEE a. CARR (1967) hatten zwar nur geringe Blüherfolge gebracht, deuteten aber in dieselbe Richtung. Daraus ist zu schließen, daß Substanzen, die ausschließlich bei LTP Blütenbildung induzieren können – wie etwa Gibberelline (LANG 1956; CLELAND a. BRIGGS 1969; CLE-

LAND a. ZEEVAART 1970) —, keinesfalls das allen Pflanzen gemeinsame alleinige „Blühhormon“ sein können, denn „das Blühhormon ist nicht artspezifisch“ (SALISBURY 1963). CHAILAK-HYANS 1968 aufgestellte Hypothese, für LTP das Gibberellin und für KTP ein hypothetisches „Anthesin“ als limitierende Faktoren anzunehmen, ist zwar interessant, aber unbewiesen.

- (2) Versuche mit sogenanntem Störlicht (Lit. siehe BÜNNING 1963) ergaben auf Grund der erarbeiteten Aktionsspektren und des auftretenden Antagonismus zwischen den beiden Lichtqualitäten Hellrot (HR) und Dunkelrot (DR), daß als Photoakzeptor für die photoperiodische Induktion sehr wahrscheinlich das Phytochromsystem eine Rolle spielt (PARKER et al. 1946, 1949; BORTHWICK et al. 1952; DOWNS 1956; HENDRICKS et al. 1956; MEIJER 1957). Allerdings ist neben dieser Niederenergieaktion (kurzes Störlicht!) noch eine Hochenergieaktion (lange Belichtungszeiten) beteiligt bzw. zu beobachten, deren Lichtakzeptor und Wirkweise noch ungeklärt sind (GRILL a. VINCE 1966; WAGNER u. MOHR 1966 a, b; HARTMANN 1966; SCHNARRENBARGER u. MOHR 1967; FRIEND 1968; ENGELSMA 1968).
- (3) Zahlreiche Versuche mit Hemmstoffen der RNS- aber auch der DNS-Synthese sprechen für die sogen. Blühhemmhypothese (DENFFER 1950). Sie besagt, daß photoperiodisch sensitive Pflanzen innerhalb eines bestimmten Entwicklungsstadiums jederzeit blühen könnten, wenn nicht die Blütenbildung durch einen bestimmten Faktor gehemmt würde, dessen Bildung unter photoperiodisch nicht induktiven Bedingungen begünstigt wird. Erste Anhaltspunkte für diese Hypothese lieferten Ergebnisse der Arbeitsgruppe LANG u. MELCHERS (1941, 1942), die durch vollständige Entblätterung und ständiges Entfernen der nachwachsenden Blattprimordien bei *Hyoscyamus niger* Blütenbildung im KT auszulösen vermochten.

WELLENSIEK et al. haben dann mehrmals, u. a. 1959 und zuletzt 1970, einen solchen „Hemmstoff“ angenommen, der durch photoperiodische Induktion entfernt werden soll, wodurch dann ein transportierbarer Blühstimulus synthetisiert werden könnte. LOCK-

HART et al. (1961) sprechen von einer in den Blättern erzeugten Substanz, die die Blütenbildung initiiert oder die einen Blütenhemmstoff zerstört, der sich normalerweise im Sproß oder an der Sproßspitze befindet; NAYLOR (1961) dagegen vermutet ein Gleichgewicht zwischen fördernden und hemmenden hormonalen Stoffen, die miteinander im Wechselspiel stehen. Auch EVANS (1960, 1962) sowie BARBAT u. OCHESANU (1965) postulieren ein alternierendes System von hemmenden und fördernden Faktoren, die die Blütenbildung steuern.

- (4) Ein weiterer Aspekt, der zur Zeit vielfach diskutiert wird, ist die Frage der Beteiligung von m-RNS an der Induktion der Blütenbildung. Hemmungsversuche mit Basenanaloga und Antibiotika lassen auf eine Neubildung spezieller m-RNS und damit auch spezifischer Enzyme schließen. Erste Versuche in dieser Richtung von HESS (1959) an *Streptocarpus wendlandii*, HESLOP-HARRISON (1960) sowie von MARUSHIGE (1962) mit 2-Thiouracil an KTP ergaben eine Hemmung der Blütenbildung, wenn das Basenanalogon während der induktiven Dunkelperiode auf die Blätter einwirkte. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß HESS „seinen“ Hemmeffekt innerhalb einer bestimmten Zeit mit Uracil revertieren konnte.

In der Folgezeit wurden weitere Antimetabolite während der Blüteninduktion sowohl auf die Blätter als auch auf den Vegetationskegel appliziert: SALISBURY a. BONNER (1960) erhielten mit 5-Fluoruracil und 5-Fluordesoxyuridin sowohl über die Blätter als auch den Vegetationspunkt eine Hemmung, wobei Revertierung mit Orotsäure möglich war; BONNER u. ZEEVAART (1962), COLLINS u. SALISBURY (1962), EVANS (1964) sowie TELTSCHEROVA et al. (1967) erzielten eine Unterdrückung der Blütenbildung bei einer Reihe von KTP und LTP mit verschiedenen substituierten Uracilen, wobei der Hemmeffekt von 5-FU durch sein Strukturanalogon Thymin aufgehoben werden kann, wenn die Gegengabe zur Zeit des Transportes erfolgt. EICHHOFF u. RAU (1969) fanden zwar bei Applikation von 2-TU auf den Vegetationskegel der LTP *Hyoscyamus niger* ebenfalls eine Hemmung, eine Infiltration von 2-TU ausschließlich in die Blätter löste dagegen im KT bis zu 80–87 % Blütenbildung aus; auch dieser Effekt ließ sich durch

Uracilinfiltration bis zu drei Tagen nach 2-TU-Gabe revertieren. 5-FU und 5-BU ergaben dagegen unter den gleichen Versuchsbedingungen keine Induktion. Gestützt werden die mit 2-TU erzielten Ergebnisse durch Veröffentlichungen anderer Autoren, die über eine Förderung der Blütenbildung durch Basenanaloga und Antibiotika berichten; so erreichten BROWN (1962) mit 5-Jod-desoxyuridin und 5-Bromdesoxyuridin sowie HIRONO a. REDEI (1966 a, b) mit 8-Azaadenin und Bromdesoxycytidin an der fakultativen LTP *Arabidopsis thaliana* — dem Nährboden der Pflanzen zugegeben — eine Vorverlegung des Blühtermins. Bei der LTP *Begonia* erzielte HEIDE (1969) durch CCC-Zufuhr über die Wurzeln ebenfalls eine Blühförderung. Die Arbeitsgruppe um GOREN a. MONSELISE (1969) bekam bei Orangenbäumen nach Behandlung mit 5-Fluordesoxyuridin, 5-Bromo-3-sec-butyl-6-methyluracil (einem Herbizid) und Chloramphenicolsuccinat während der induktiven Phase eine Erhöhung der Blütenzahl.

Die vor allem mit Hilfe von Antimetaboliten erzielten Versuchsergebnisse zur Blütenbildung veranlaßten BONNER u. ZEEVAART (1962), LANG (1965), SEARLE (1965), BERNIER (1966), CHAILAKHYAN (1968), WARDLAW (1968), KANDELER (1969), BRONCHART, BERNIER et al. (1970) u. a. zu der vereinfacht wiedergegebenen Annahme: An der Blühinduktion sind sowohl die Nucleinsäuren — speziell RNS — als auch eine Proteinneusynthese entscheidend beteiligt.

Die zuletzt aufgezeigten bzw. angedeuteten Untersuchungen zur Klärung des Mechanismus der Blühinduktion befaßten sich bislang vorwiegend mit dem Gesamtvorgang dieses Phänomens.

Auf Grund unserer heutigen Kenntnisse steht aber mit ziemlicher Sicherheit fest, daß die photoperiodische Induktion, verbunden mit einer Synthese des „Blühhormons“, in den Blättern einerseits und die Umsteuerung des Vegetationspunktes in Richtung auf die Bildung von Blüten andererseits zwei zwar wahrscheinlich nicht unabhängige, aber doch räumlich und zeitlich getrennte Teilprozesse sind. Nachdem EICH-HOFF u. RAU (1969) nachweisen konnten, daß 2-Thiouracil je nach Wirkungsort die Blütenbildung sowohl verhindern als auch induzieren kann, liegt die Vermutung nahe, diese beiden Teilprozesse seien so konträr, daß Antimetabolite und Hemmstoffe sie in unterschiedlicher

Weise beeinflussen. Einigermmaßen kompetente Aussagen über den jeweiligen Mechanismus lassen sich deshalb auf Grund von Versuchen mit solchen Stoffen nur dann machen, wenn sichergestellt ist, welcher Teilprozeß betroffen ist.

Aus diesen Überlegungen leiteten wir Ziele und Aufgaben der vorliegenden Arbeit ab. Zunächst mußte geprüft werden, ob neben dem Antimetaboliten 2-TU auch Hemmstoffe der Proteinsynthese eine doppelte Wirkung auf die Blütenbildung haben — speziell, ob sie Blütenbildung auszulösen vermögen; dabei hofften wir, durch Verwendung von verschiedenen Proteinsynthesegiften mit jeweils speziellem Angriffsbereich im Stoffwechsel weitere Anhaltspunkte über die an der Blüteninduktion beteiligten Systeme zu erhalten. Die weiteren Untersuchungen sollten sich dann darauf konzentrieren, ob und in welchem Umfang bei der Blühinduktion in den Blättern Änderungen der Proteinsynthese stattfinden; dabei schienen vor allem vergleichende Versuche zwischen einer Induktion durch photoperiodische Behandlung und durch Applikation von Hemmstoffen interessant.

Die vorliegende Arbeit sollte vor allem auch einen Beitrag zur Lösung der Frage liefern, ob die von vielen Autoren geäußerte Ansicht, daß an der photoperiodischen Steuerung der Blütenbildung Änderungen im Nucleinsäure- und Proteinstoffwechsel beteiligt sind, nicht nur für die Umsteuerung am Vegetationspunkt zutrifft — was als nahezu bewiesen anzusehen ist —, sondern ebenfalls für den Mechanismus der Bildung oder Aktivierung des Blühstimulus im Blatt gilt.

B. MATERIAL UND METHODE

I. PFLANZENMATERIAL UND ANZUCHT

1. Pflanzenmaterial

Die Solanaceae *Hyoscyamus niger* (Bilsenkraut) ist eine qualitative LTP; wir verwendeten die einjährige, gelbblühende Rasse, und zwar eine durch ständige Selbstbestäubung gewonnene Nachzucht des von MELCHERS (1937) isolierten Materials. Sie hat eine definierte kritische Tageslänge von ca. 11 Stunden und kann im KT unbegrenzt obligat vegetativ kultiviert werden. Die photoperiodische Empfindlichkeit von *Hyoscyamus niger* scheint einen rhythmischen Jahresgang zu haben; Pflanzen, die in den Monaten Dezember — Januar optimalen Blühbedingungen ausgesetzt wurden, zeigten nur geringe bis keine Blütenausbildung.

Hyoscyamus niger war für unsere Versuche außerdem besonders deshalb geeignet, weil sich wegen ihres Rosettenwuchses im vegetativen Zustand sowohl Blätter als auch Vegetationspunkt verhältnismäßig leicht selektiv mit Substanzen behandeln lassen.

2. Anzucht

Nach der Keimung der Samen in sterilisierter Gartenerde wurden die jungen Schößlinge in Tonschalen pikiert und nach vier bis sechs Wochen einzeln in mittelgroße Töpfe (durchschnittlicher Durchmesser 8 cm) gepflanzt. Die Anzucht erfolgte im Gewächshaus bei Tageslicht; in den Wintermonaten wurde das natürliche Licht durch Glühlampen (Philips Comptalux 300 W) ergänzt. Die Temperatur sank auch in der Nacht nicht unter 16–18° C, im Mittel lag sie am Tag bei 23° C. Die tägliche Lichtperiode betrug acht bis zehn Stunden; sie wurde durch Abdecken mit Dunkelstürzen bzw. mit einem Dunkelzelt begrenzt. Zu Versuchsbeginn waren die Pflanzen zwischen drei und vier Monate alt; sie hatten zu diesem Zeitpunkt schon eine kleine Rübe ausgebildet.

Für einige vergleichende Versuche mit Bohnen (*Phaseolus multiflorus*) nahmen wir von zwei bis drei Wochen alten Exemplaren die beiden Primärblätter, die dann gerade voll entwickelt sind (der Folgesproßteil war jeweils gekappt worden). Als Besonderheit sei am Rande erwähnt, daß die Bohnen bei der Kultivierung in Blumentöpfen nach einigen Monaten rübenartige halbunterirdische Verdickungen der Hauptwurzel bzw. des Hypocotyls ausbildeten; dieser scheinbare Reservespeicher (er enthält größtenteils Stärke) erwies sich als Dauerorgan, wenn die Pflanzen mehrere Jahre im Gewächshaus gehalten werden (er ist aber nicht kälteresistent) und treibt im Frühjahr jeweils – nun schon im dritten Jahr – neu zu einer vollständigen Pflanze aus.

Gegen Pflanzenschädlinge (wie Blattläuse, Rote Spinne und Weiße Fliege) wurden Metasystox, Rospin und E 605 eingesetzt. Die Versuchspflanzen erhielten jedoch ca. zwei Wochen vor Versuchsbeginn und während der ersten drei Wochen der Reaktionszeit keine Pflanzenschutzmittel; Vorversuche hatten nämlich für den Zeitraum der Induktion eine gewisse negative Beeinflussung durch diese Gifte ergeben.

II. BLÜTENBILDUNG

1. Versuchsdurchführung

Zur Blütenbildung verwendeten wir ausschließlich die LTP *Hyoscyamus niger*.

Die Präparation der vegetativen Pflanzen erfolgte nach der von EICHHOFF u. RAU (1969) angegebenen Methode: Alle Blätter, bis auf die drei (in einzelnen Versuchen sechs) jüngsten, voll entwickelten, wurden (z. T. unter einem Präpariermikroskop) entfernt; außerdem blieben zum Schutz des Vegetationspunktes die acht bis zehn innersten Blattprimordien als „innerer Kegel“ stehen.

a) Behandlung mit Antimetaboliten

Die selektive Behandlung des Vegetationspunktes mit Versuchslösungen erfolgte mittels eines über den inneren Kegel gestülpten Glasröhrchens (vgl. EICHHOFF u. RAU 1969) oder durch aufgelegte getränkte Wattebäusche.

Die Applikation der zu testenden Substanzen in die ausgewachsenen Blätter wurde mittels der von LANG u. MELCHERS (1943) beschriebenen Vakuum-Infiltrationsmethode durchgeführt: Die Pflanzen werden dazu umgekehrt auf einer Lochplatte in einen Exsikkator so eingehängt, daß nur die Blätter in die zu infiltrierende Lösung eintauchen. Bei guter Beleuchtung reichte eine zweimalige, jeweils 15 Min. lange Evakuierung zur vollständigen Infiltration aus (die Blätter waren danach auf der gesamten Fläche durchscheinend); zur Verdunstung der Infiltrationslösung aus den Interzellularen wurden die Pflanzen in einen schwachen, warmen Luftstrom gebracht.

b) Störlichtversuche

Dazu wurde den Pflanzen zusätzlich zu normalen KT-Bedingungen in der Mitte der Dunkelperiode 1½ Stunden Rotlicht (Leuchtstoffröhren Philips TL 40 W, Lichtfarbe 15; davor rote Plexiglasscheibe Röhm & Haas, Darmstadt, Nr. 501) gegeben; dieses Rotlicht entsprach dem Standard-Hellrotfeld nach MOHR u. PINNIG (1962).

Bei weißem Störlicht wurde mit je zwei Leuchtstoffröhren vom Typ Osram L-Fluora / 40 Watt und zwei Glühlampen von 25 Watt bestrahlt.

c) Dauerlichtversuche

Dauerlicht wurde durch Zusatzlicht während der natürlichen Nacht mit Glühlampen vom Typ Comptalux Philips 300 Watt erzielt. Diese Experimente waren so angesetzt, daß in der zwischen zwei KT liegenden Nacht das Zusatzlicht ständig brannte.

d) Langtagversuche

Die Pflanzen erhielten dabei je 16 Std. Licht pro Tag; das Zusatzlicht stammte ebenfalls von Comptalux-300-Watt-Glühlampen.

Während der gesamten Versuchszeit standen die meisten Pflanzen im Gewächshaus; einige Versuche konnten auch in einer temperaturkonstanten ($20 \pm 1^\circ \text{C}$) Belichtungskammer durchgeführt werden (Beleuchtungsaggregate: je zwei Leuchtstoffröhren vom Typ Osram L-Fluora / 40 Watt und zwei Glühlampen von je 25 Watt). Nach dem

Versuch erhielten die Pflanzen bis zur Auswertung wieder bzw. weiterhin KT-Bedingungen im Gewächshaus.

2. Auswertung

Die behandelten Pflanzen wurden ca. sechs Wochen nach Versuchsbeginn unter einem Präpariermikroskop auf das Vorhandensein von Blütenanlagen hin untersucht; als Blütenanlagen galten nur tatsächlich sichtbare Blütenknospen — dagegen nicht erhöhte Vegetationspunkte (siehe LANG u. MELCHERS 1943). Zusätzlich erfolgte die Bestimmung des Blattzuwachses, d. h. der Anzahl der nach Versuchsbeginn neu gebildeten Blätter. Nach LANG u. MELCHERS (1943) stellt nämlich der Blattzuwachs bei *Hyoscyamus niger* ein Maß für die Stärke der photoperiodischen Blühinduktion dar, weil die Anlage von Blütenknospen selbst dem Alles-oder-Nichts-Gesetz folgt.

III. ATMUNGSMESSUNGEN

Zur Messung der Sauerstoffaufnahme und des respiratorischen Quotienten (RQ) der Blätter wurde die manometrische Methode nach WARBURG herangezogen.

Die Versuchsdurchführung erfolgte in der von RAU (1962) beschriebenen Weise in kästchenförmigen Reaktionsgefäßen mit seitlicher Ansatzbirne; die ausgestanzten Blattstücke liegen dabei im Reaktionsgefäß auf Einsatzgittern aus Kunststoff im fast wassergesättigten Raum. In der Ansatzbirne befinden sich 10%ige KOH und zur Oberflächenvergrößerung Filterpapier. Als Maß für die Atmungsintensität diente die pro 30 Min. aufgenommene Sauerstoffmenge durch sechs Blattstücke von je 1 cm² bei 25° C.

Den RQ bestimmten wir nach der Zwei-Gefäß-Methode.

IV. PROTEINSYNTHESE

Die Proteinsynthese wurde durch Messung der Zu- oder Abnahme des Gehalts an löslichen Proteinen pro cm² Blattfläche und durch die Ein-

bauraten von L-Leucin-1- ^{14}C in die löslichen Proteine (Def. siehe 3 b) ermittelt.

1. Bedingungen für die Versuchspflanzen

a) Versuche mit isolierten Blättern

aa) Blätter von unbehandelten Pflanzen wurden nahe dem Blattgrunde mit einer Rasierklinge abgeschnitten und in einigen Fällen sofort mittels Vakuum-Infiltrationsmethode mit den jeweiligen Testlösungen (als Kontrolle mit entsalztem Wasser) gleichmäßig inkubiert; anschließend wurden unter schwachem, warmem Luftstrom die Interzellularen ausgetrocknet, wobei gleichzeitig die Fütterung mit ^{14}C -Leucin durch Aufsaugen über den Blattstiel erfolgte.

Die ganze Prozedur dauerte im Normalfall zwischen einer und drei Stunden.

bb) In den anderen Fällen konnten die abgeschnittenen Blätter ohne Infiltration das ^{14}C -Leucin aufsaugen; sie wurden danach in Nährlösung gestellt und verschiedenen Photoperioden ausgesetzt.

b) Versuche mit Blättern, die an der Pflanze reagierten

aa) Dabei wurden die Blätter der einen Versuchsgruppe – wie schon bei den Versuchen zur Blütenbildung – an der Pflanze mit den jeweiligen Testlösungen (Antimetabolite, H_2O) infiltriert und dann an der Pflanze im schwachen Luftstrom getrocknet. Die Fütterung mit ^{14}C -Leucin erfolgte zu verschiedenen Zeiten nach der Infiltration, so daß die Blätter verschieden lang unter der Wirkung der Antimetabolite an der Pflanze verblieben und reagierten, bevor mittels markierter Aminosäure die aktuelle Aktivität der Proteinsynthese gemessen wurde.

bb) Für andere Versuche wurden die Blätter an der Pflanze verschiedenen photoperiodischen Bedingungen ausgesetzt, nach verschieden langen Zeiträumen abgeschnitten und kurzzeitig mit ^{14}C -Leucin gefüttert. Die Einbauzeit für das ^{14}C -Leucin betrug entweder 24 Std. (als annähernder Optimalwert) oder sechs Std. (als annähernde Pulsmarkierung); die Blätter standen dabei in Nährlösung. In Vorversuchen hatte sich eine Adaptation der Blätter an die veränderten Versorgungsbedingungen (Blatt an der Pflanze: → abgeschnittenes Blatt) durch 30- bis

40minütiges Einstellen in Leitungswasser als vorteilhaft für die Erhaltung der Turgeszens erwiesen.

2. Messung der Proteinneusynthese durch L-Leucin-1-¹⁴C-Markierung

Pflanzengeweiben appliziertes markiertes L-Leucin wird verhältnismäßig spezifisch für die Proteinsynthese verwendet (JOY a. FOLKES 1965; LARSON a. BEEVERS 1965). Wir haben deshalb als Nachweis für die Aktivität der Proteinsynthese den Einbau von L-Leucin-1-¹⁴C in die lösliche Proteinfraction der unter den jeweiligen Versuchsbedingungen reagierenden Blätter von *Hyoscyamus niger* gemessen.

a) Einmalige ¹⁴C-Leucin-Gabe (= „Fütterung“) mit verschiedenen langen Einbauzeiten

Die abgeschnittenen Blätter wurden zur Messung der Proteinneusynthese — wie schon kurz erwähnt — in sterile Bechergläser gestellt, in denen sich in 1 ml Knopscher Nährsalzlösung 1 μ C ¹⁴C-Leucin befand. Im schwachen Luftstrom und unter öfterem leichtem Besprühen der Blätter mit Wasser (um ein Schlawfen zu vermeiden!) konnte auf diese Weise die angebotene markierte Aminosäure über den Blattstiel aufgenommen werden. Die Blätter hatten diesen ¹⁴C-Puls in durchschnittlich ein bis zwei Std. aufgesogen. Sobald die letzte Spur der radioaktiven Lösung aufgenommen war, erhielten die Blätter reine Knopsche Nährlösung.

Die Einbauzeit für das ¹⁴C-Leucin betrug zwischen sechs Std. und 96 Std. (in Einzelfällen auch bis zu 120 Std.). Nach Versuchsende wurde die Fläche der Blätter planimetrisch erfaßt (sie diente als Bezugsgröße zur Berechnung der Proteinmenge pro cm² bzw. der lpm pro cm² Blattfläche) und dann das ganze Blatt sofort bei — 25° C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Vorversuche hatten ergeben, daß eingefrorene Blätter im wesentlichen die gleichen löslichen Proteingehalte aufweisen wie Frischmaterial.

b) Ständige ¹⁴C-Leucin-Gabe

Der Unterschied zur eben beschriebenen einmaligen „Puls“markierung bestand darin, daß die abgeschnittenen Blätter während der gesamten Einbauzeit — also je nach Versuchsdauer zwischen sechs Std. und 96 Std. — ständig mit ¹⁴C-Leucin versorgt wurden, wobei die Konzen-

tration dieser Inkubationslösung gleichmäßig $1 \mu\text{C } ^{14}\text{C}$ -Leucin pro 10 ml Nährlösung betrug. Der durchschnittliche Verbrauch an Nährlösung belief sich pro Blatt in den ersten sechs Std. zwischen 3 und 5 ml (je nach Bedingung); in der Folgezeit verringerte sich die Aufsauggeschwindigkeit merklich und ging nach 96 Std. gegen Null. Dies steht im Einklang mit der Angabe CHAILAKHYANS (1968), daß abgeschnittene Blätter von LTP nach mehreren Tagen den Turgor verlieren, altern und absterben (sie bilden keine Wurzeln aus!); erste äußere Anzeichen dieser Reaktion zeigten sich bei abgeschnittenen Hyoscyamusblättern meist nach drei bis vier Tagen. Aus diesem Grund haben wir in den Abbildungen die Werte meist nur bis 96 Std. nach dem Abschneiden des Blattes aufgetragen.

3. Extraktion und quantitative Bestimmung des Gesamtproteins

a) Extraktion des löslichen Proteins

Von den bei -25°C tiefgefrorenen Blättern wurden der Blattstiel und die Mittelrippe entfernt (gesonderte Messung!) und allein die Spreite zur Extraktion des Proteins verwendet. Der Aufschluß erfolgte in ca. 2 ml Tris-HCl-Puffer (nach v. LOON und v. KAMMEN 1968, verändert: 0,1 m Tris-HCl-Puffer, 0,5 m Saccharose, 0,1 % Ascorbinsäure und $5 \cdot 10^{-3}$ m Mercaptoäthanol bei pH 7,5) durch 10minütiges Zerreiben unter Eiskühlung mittels eines eingeschliffenen Glashomogenisators (Volumen: 5 ml) nach POTTER und ELVEHJEM (Fa. Braun, Melsungen).

Das Homogenat (= Rohextrakt) wurde anschließend zweimal (25 Min. und nochmals 35 Min.) mit $50\,000 \times g$ bei $2-4^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert (Zentrifuge: Christ Omikron bzw. WKF P 50 K). Der klare, leicht grünliche Überstand, der u. a. die löslichen Proteine enthält, wurde auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt; aus je einem Aliquot erfolgten Proteinbestimmung und Messung des Einbaus der radioaktiven Aminosäure ins Protein.

b) Bestimmung des löslichen Proteins

Definition: Unter löslichen Proteinen werden in dieser Arbeit die nach Zentrifugation mit 2×30 Min. bei $50\,000 \times g$ im Über-

stand verbleibenden, mit TCA fällbaren Proteine bzw. Proteinpartikel oder Proteine enthaltenden Organelle des Blatthomogenats verstanden.

aa) Nephelometrische Methoden

Zum Erfassen der Proteinkonzentration diente die Bestimmung der Trübung, die durch Fällung des Proteins mit TCA hervorgerufen wird. Zu 1,4 ml Überstand des Rohextraktes wurden 2,1 ml 10%ige TCA gegeben und nach 30 Sek. die Extinktion im Spektralphotometer (Hitachi Perkin-Elmer, UV-VIS, Modell 139) bei 450 nm gemessen. Die durch Zentrifugation von dem Proteinpräzipitat befreite Probe, erneut bei 450 nm gemessen, ergab einen in der Fehlergrenze liegenden Wert, so daß eine Korrektur der vorher gemessenen Extinktion wegfallen konnte. Als Standard für die Eichkurve diente eine Lösung von Rinder-Serum-Albumin in unserem Tris-HCl-Puffer. Die durch TCA hervorgerufene Trübung stellt im Bereich zwischen 0,1 mg und 3,0 mg Protein eine lineare Funktion der in der Lösung enthaltenen Menge dar; unsere Werte lagen um 1 mg Protein pro Probe.

Bei den Proteinbestimmungen nach Auftrennung an Sephadex-Gel G 200 verwendeten wir zusätzlich als Fällungsagens 10%ige Sulfosalicylsäure; die übrigen Arbeitsgänge waren die gleichen wie bei der TCA-Methode.

Als vergleichende Messung führten wir die Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (1951) durch, bekannt auch unter der Bezeichnung: Proteinbestimmung mit Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz. Da bei dieser Methode jedoch z. B. Phenole (allgemein: aromatischer Ring mit OH-Gruppe) und manche Puffersubstanzen (z. B. Tris) den Nachweis stören, lagen die Werte generell um 40 bis 50 % höher als bei der TCA-Bestimmung. Der Vorteil der Folin-Methode lag darin, daß sehr kleine Proteinmengen (zwischen 0 und 100 g pro Probe) für Vergleichszwecke erfaßt werden konnten; die Absorptionsmessung im Photometer erfolgte bei 750 nm.

bb) Ultraviolettabsorption der Proteine bei 260 und 280 nm – für Gelchromatographie

Zur Identifizierung von nicht gefällten Proteinen wurde die von BAILEY (1962) beschriebene Methode durch Absorptionsmessung im

UV-Licht bei 280 nm angewandt. Diese Methode erwies sich bei der Proteinbestimmung zur Gelchromatographie als vorteilhaft, weil hier hinreichend getrennte Fraktionen vorlagen.

Neben dieser Extinktionsablesung bei 280 nm, kann durch Parallelmessung bei 260 nm nach WARBURG u. CHRISTIAN (1941) mit der von KALCKAR errechneten Formel eine zusätzliche Überprüfung von vorgereinigten Proteinlösungen erfolgen:

$$\text{Protein in mg/ml} = 1,45 E_{280} - 0,74 E_{260}.$$

Als zusätzliche Charakterisierung der Fraktionen bzw. um den Reinheitsgrad der Proteine zu erfassen, diente die Ermittlung des Verhältnisses $E_{260} \text{ nm} / E_{280} \text{ nm}$; wenn dieses Verhältnis größer als 2 ist, so zeigt das einen hohen Gehalt an Nukleinsäuren an, Werte darunter entsprechen dagegen verhältnismäßig reinen Proteinlösungen (siehe BAILEY 1962).

c) Bestimmung der unlöslichen Proteine

Sie erfolgte aus dem Zentrifugat des Homogenats durch Bestimmung des Stickstoffgehaltes nach KJELDAHL; im wesentlichen wurden damit die Strukturproteine erfaßt. Als Kontrollgröße wurde außerdem das Gesamtprotein der Blattspreite nach der gleichen Methode ermittelt.

d) Bilanz der Proteine

Da neben dem Gesamtprotein auch die löslichen und unlöslichen Proteine gesondert erfaßt wurden, war damit für die Proteinbilanz eine zusätzliche Kontrolle zur Absicherung der einzelnen Werte gegeben.

4. Messung der Radioaktivität

Zur Radioaktivitätsbestimmung standen ein Methandurchflußzähler mit automatischem Probenwechsler der Fa. Frieseke und Höpfner sowie die Szintillationszähler Beckman LS 100 und LS 250 (letzterer mit Kühlung auf $+ 6^{\circ} \text{C}$ zur weitgehenden Vermeidung von Chemolumineszenzen) zur Verfügung.

a) Methandurchflußzähler (^{14}C -Gehalt fällbaren Proteins)

Um den Einbau von $\text{L-}^{14}\text{C}$ -Leucin in die löslichen Proteine feststellen zu können, mußte das Protein aus dem durch Zentrifugation des

Gesamtextrakt des erhaltenen Überstandes möglichst quantitativ erfaßt werden. Zu 2 ml dieses Überstandes ($= \frac{1}{25}$ der Gesamtlösung) wurden 5 ml 10%ige gekühlte TCA pipettiert und das Ganze ca. zwei Std. zur Ausfällung des Proteins unter mehrmaligem Schütteln stehen gelassen (Vorversuche hatten ergeben, daß schon eine Std. nach Zugabe der TCA keine weitere Ausbeute zu erwarten ist).

Das gefällte Protein wurde mittels Glasfaserfilter GF/C 2,4 cm ϕ (Fa. Whatman) unter dem Sog einer Wasserstrahlpumpe von der übrigen Lösung abgetrennt und dreimal mit je 5 ml 10%iger eisgekühlter TCA und zum Trocknen mit 5 ml 70%igem Äthanol (-25°C) gewaschen. Das gefällte Protein samt Membranfilter konnte dann auf Aluminiumblättchen geklebt und — nach schonender Trocknung — der ^{14}C -Gehalt im Methandurchflußzähler gemessen werden. Die Zählausbeute betrug dabei unter unseren Bedingungen um 33 %.

b) Szintillationszähler (^{14}C -Gehalt nicht fällbaren Proteins)

Die Bestimmung der Radioaktivität wäßriger Lösungen (Gesamtüberstand, Fütterungsrückstände usw.) erfolgte im Szintillationszähler in Dioxan-Cocktail mittels Zählgläsern aus kaliumarmem Glas; der Cocktail enthielt 100 g Naphthalin, 5 g PPO und 1 l Dioxan (eine zusätzliche Gabe von POPOP hatte starke Chemolumineszenz verursacht).

Zu 1 ml Proteinlösung (Überstand des Rohextraktes) wurden 10 ml eisgekühlter Dioxan-Cocktail pipettiert und im Beckman-Szintillationszähler gemessen. Bei einigen Versuchsreihen mußten auftretende Trübungen mit „Solune 100“ (Sample Solubilizer — eine starke organische Base, Fa. Packard) beseitigt werden, indem zu der Proteinlösung 1 ml Solune gegeben wurde; diese Mischung mußte bei 50°C mehrere Stunden reagieren. Die durch Solune ausgelöste Chemolumineszenz konnte durch 24stündige Wartezeit in der Kälte gelöscht werden. Die Zählausbeute lag um 70 %.

c) Gesamtbilanz der Radioaktivität

Die Gesamtbilanz sollte einen Überblick der quantitativen Verteilung des eingesetzten ^{14}C -Leucins im gesamten Blatt geben.

Da die Messung des ^{14}C -Gehaltes des Zentrifugierüberstandes verhältnismäßig unproblematisch zu bewerkstelligen war (siehe vorhergehende Radioaktivitätsbestimmung), verblieb noch die Erfassung der

festen Rückstände, nämlich der unlöslichen Bestandteile der Blattspreite ($\hat{=}$ Zentrifugat) und der Blattstiele. Nachdem 48stündige Hydrolyse mit HCl bei 100° C in zugeschmolzenem Reagenzglas keine befriedigende Wirkung erzielte, konnten die gesuchten Größen in der nach KALBERER u. RUTSCHMANN (1961) verbesserten SCHÖNINGER-Verbrennungsapparatur ermittelt werden*). Gezählt wurde die Radioaktivität in der CO₂-Absorptionslösung (methanolische Äthanolaminlösung) im Beckman-LS-250 bei + 6° C; als Szintillationsflüssigkeit verwendeten wir dabei Toluol-Cocktail (1 l Toluol + 5 g PPO). Die Zählhausbeute lag um 80 %.

d) Autoradiographie

Um die Verteilung der Radioaktivität in der Gesamtfläche des Blattes, vor allem der Spreite, optisch feststellen zu können, wurden die mit ¹⁴C-Aminosäure gefütterten Blätter in einer Pflanzenpresse bei 150° C Anfangstemperatur im Trockenschrank abgetötet, bei 80° C ca. 36 Std. weitergetrocknet und diese Blätter dann drei bis vier Wochen auf Röntgenpapier exponiert.

5. Fraktionierung der Proteine

a) Ammoniumsulfatfällung

Ein Teil des Überstandes des Rohextraktes, in dem das lösliche Protein enthalten ist, wurde mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung stufenweise auf den Sättigungsgrad 30 %, 50 %, 70 % und der Rest mit 50%-iger TCA auf eine TCA-Endkonzentration von 10 % gebracht. Der jeweils unter ständigem Rühren erhaltene Niederschlag wurde durch Glasfaserfilter GF/C mittels Wasserstrahlpumpe abfiltriert, mit der entsprechenden Ammoniumsulfat-Konzentration mehrmals gewaschen, mit TCA fixiert, mit 70%igem Äthanol getrocknet und danach die ¹⁴C-Aktivität im Methandurchflußzähler bestimmt.

b) Gelfiltration über Sephadex G 200

Das Polydextran Sephadex G 200 ist u. a. zur Trennung von Proteinen bzw. Peptiden mit einem Molekulargewicht zwischen 5000 – 800 000

*) Dem Labor Prof. Dr. Beck danken wir für technische Hilfe bei diesen Versuchen.

geeignet; sie werden dabei in der Reihenfolge abnehmender Molekülgröße eluiert.

Zur Bereitung der Säule wurde Sephadex G 200 im Elutionspuffergemisch (10^{-2} m Tris-HCl-Puffer mit 0,1 m KCl und $5 \cdot 10^{-3}$ m Mercaptoäthanol bei pH 7,5) drei Tage vorgequollen und in ein Chromatographierohr ($80 \times 2,5$ cm) so eingefüllt, daß die Gelhöhe 70 cm betrug. Die Extraktion des Proteins aus dem Blatt im Glashomogenisator erfolgte mit möglichst wenig 0,1 m Tris-HCl-Puffer pH 7,5, dem neben 0,5 m Saccharose noch $5 \cdot 10^{-3}$ m Mercaptoäthanol zugefügt war. Nach der Zentrifugation (2×30 Min. bei $50\,000 \times g$) wurde der Überstand gegen den gleichen Puffer ca. sechs Stunden dialysiert; alle Arbeitsgänge fanden bei $0-4^{\circ}\text{C}$ statt. Diese konzentrierte Lösung wurde dann durch vorsichtiges Unterschichten der über dem Gel stehenden Pufferlösung auf den auf der Säulenfüllung liegenden Siebkorb aufgetragen. Die Durchlaufgeschwindigkeit des Elutionspuffers betrug 2 Tropfen/Min. Das Eluat wurde zur Bestimmung der darin enthaltenen Proteine mit dem LKB-Ultraviolett-Absorptiometer Uvicord II bei 280 nm gemessen, von dem LKB-Schreiber aufgezeichnet und in Fraktionen zu 5 ml Volumen vom LKB-Fraktionskollektor Ultrarac aufgefangen. Das Elutionsvolumen pro Fraktionierung lag stets um 500 ml, mit der gleichen Menge wurde die Säule nochmals nachgewaschen.

Zur Grobeichung der Gelsäule diente Dextranblau (MG um 1 Mill.); es zeigt die Front des Eluats an. Bei unserer Säule erschien es zwischen Fraktion 17 und 21 mit scharfem Gipfel bei Nummer 19, also nach etwa 100 ml Elutionsvolumen. Zum Erfassen der Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde je 1 ml entnommen und im Dioxan-Cocktail mit dem Szintillationszähler LS 250 gemessen.

Da wir bei der Gelfiltration den gesamten Überstand der $50\,000 \times g$ -Zentrifugation, also keine reine Proteinlösung auftrugen, war nicht gesichert, daß die vom Absorptiometer aufgezeichneten Werte tatsächlich allein dem absoluten Proteingehalt entsprachen. Es wurden deshalb die schon beschriebenen nephelometrischen Methoden zur zusätzlichen Proteinbestimmung herangezogen. Um aber wiederum eventuelle Fehlerquellen auch von dieser Seite – z. B. mit organischen Säuren nicht ausfällbares Protein – zu vermeiden, erwies es sich für vergleichende Betrachtungen als vorteilhaft, als Bezugsgröße die absolute 280-nm-Absorptionshöhe der Kurve in cm pro Fraktion zu neh-

men, um damit die relative spezifische Aktivität: Ipm pro 1 ml Proteinlösung pro Absorptionseinheit zu berechnen; diese Werte entsprachen in den entscheidenden Fraktionen den durch die speziellen Proteinbestimmungen ermittelten spezifischen Einbauraten pro Proteinmenge.

V. VERWENDETE SUBSTANZEN

1. Antimetabolite und Hemmstoffe

Die Antimetabolite wurden so ausgewählt, daß die Proteinsynthesekette an verschiedenen Stellen unterbrochen werden konnte.

Cycloheximid (= Actidion): Es soll ausschließlich an 80 S Ribosomen (speziell 60 S Untereinheit) den Transfer der Aminosäuren von Aminoacetyl-t-RNS zu Polypeptiden hemmen (Liter.: ROSE 1970; ELLIS a. MAC DONALD 1970); damit werden also spezifisch die cytoplasmatischen Ribosomen betroffen. Bezugsquelle: Fa. C. Roth, Karlsruhe.

2-Thiouracil: wird in die RNS eingebaut und wirkt dann als Inhibitor von Entwicklungsprozessen (HESS 1959; BERNIER et al. 1970) — damit stand also ein Hemmstoff auf Nucleinsäurebasis zur Verfügung. Bezugsquelle: Fluka AG, Buchs SG.

Chloramphenicol: verhindert die Bildung energiereicher Phosphatverbindungen und blockiert die Peptidyl-Transferase spezifisch an 70 S Ribosomen (BELLINGTON, HEYES 1970; MARGULIES, BRUBAKER 1970) — in unserem Fall wird also besonders die Proteinsynthese in den Chloroplasten und Mitochondrien beeinträchtigt. Bezugsquelle: Firma Bayer, Leverkusen (als Leucomycin).

Puromycin: Es wirkt an der A-Haftstelle der Ribosomen offenbar als inaktives Analogon (Antimetabolit) einer aktivierten Aminosäure (speziell: t-RNS für Phenylalanin und Tyrosin), wodurch die Verknüpfung von Aminosäuren unterbunden wird —, daher können nur kurze Peptidstücke synthetisiert werden (HARTMANN et al. 1968; ELLIS 1969). Bezugsquelle: Serva, Heidelberg.

In Abb. 1 sind die verschiedenen Angriffsorte an einem Schema verdeutlicht.

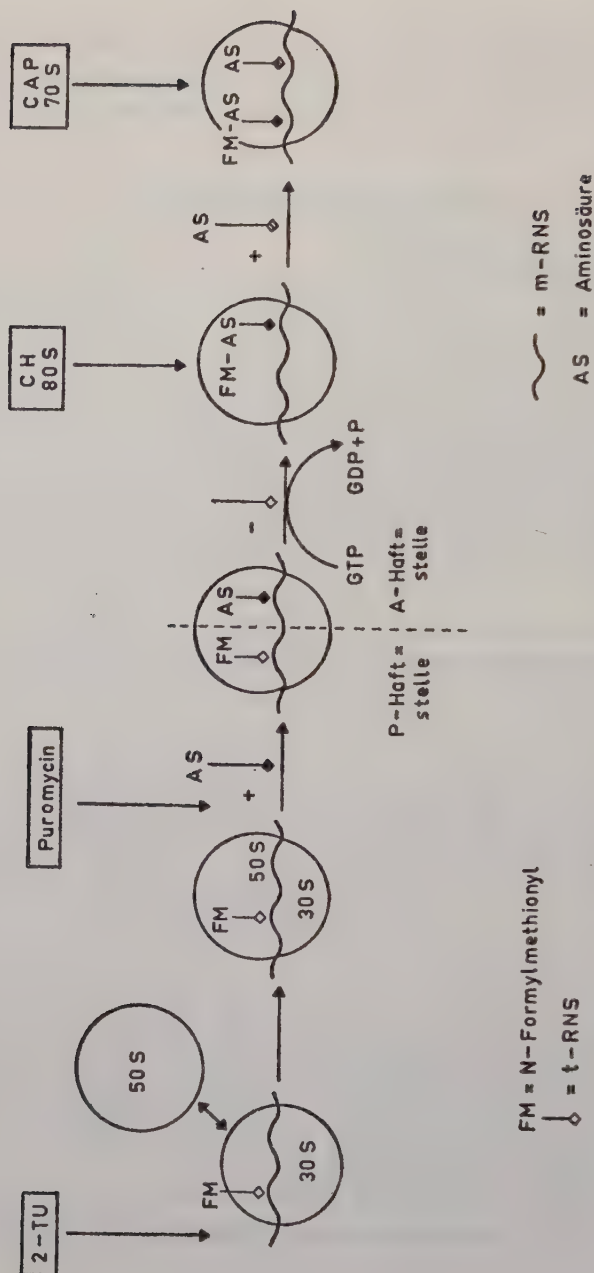


Abb. 1: Vermutliche Angriffsorte einiger Antimetabolite bei der Proteinsynthese
(nach HARTMANN et al. verändert, am Bsp. von *E. coli*).

2. Chemikalien

Es werden nur die wesentlichen der verwendeten Chemikalien genannt; sie waren von größtmöglicher Reinheit.

L-Leucin-1-¹⁴C, spez. Akt. um 58 mC/mM von "The Radiochemical Centre", Amersham.

Uracil puriss., Fluka AG, Buchs SG.

5-Sulfosalicylsäure p.a. E. Merck, Darmstadt.

Serum Albumin vom Rind, reinst, Behringwerke AG, Marburg/Lahn.

Soluene-100, Fa. Packard, Zürich.

Sephadex G 200 normal, Fa. Pharmacia C. Roth, Karlsruhe.

Dextranblau, Fluka AG, Buchs SG.

C. ERGEBNISSE

I. INDUKTION DER BLÜTENBILDUNG

1. Prüfung der photoperiodischen Empfindlichkeit von *Hyoscyamus niger*

Nach LANG u. MELCHERS (1943) sind zur vollständigen Auslösung der Blütenbildung bei *Hyoscyamus niger* sechs Langtage (LT) von je 16 Std. notwendig; die Schwelleninduktion liegt bei 3 LT. EICHHOFF u. RAU (1969) fanden eine geringere Empfindlichkeit (allerdings meist unter künstlicher Beleuchtung), so daß ein Test für unser Pflanzenmaterial unter unseren Bedingungen nötig war. Das Ergebnis ist aus Tab. 1 zu ersehen.

Tab. 1: Prüfung der photoperiodischen Empfindlichkeit von *Hyoscyamus niger* in Abhängigkeit von verschiedenen Lichtbedingungen.

DLT = Tage Dauerlicht

SLT_{HR} = KT + hellrotes Störlicht

LT = 16-Std.-Langtage

SLT_W = KT + weißes Störlicht

Bedingungen	Vers.- pflanzen	Aus- wertbar	Blühend			Vegetativ		
			Zahl	%	Blatt- zuwachs	Zahl	%	Blatt- zuwachs
3 LT	10	9	4	45	10	5	55	26
5 LT	10	9	5	56	12	4	44	20
7 LT	10	10	10	100	7	0	0	—
9 LT	6	6	6	100	7	0	0	—
1 DLT	10	10	0	0	—	10	100	23
2 DLT	15	15	13	86	10	2	14	22
3 DLT	30	29	28	97	8	1	3	16
4 DLT	10	10	10	100	7	0	0	—
5 DLT	10	10	10	100	5	0	0	—
7 DLT	16	16	16	100	5	0	0	—
3 SLT _W	8	8	0	0	—	8	100	18
7 SLT _W	18	18	1	6	10	17	94	16
10 SLT _W	16	8	5	67	12	3	33	21
7 SLT _{HR}	20	15	1	7	15	14	93	?
21 SLT _{HR}	10	7	0	0	—	7	100	?

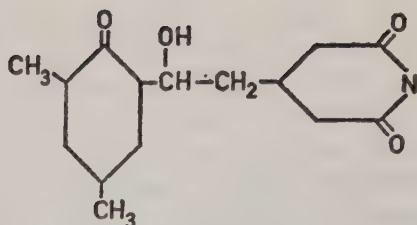
Im 16-Std.-LT genügen fünf LT, um über 50 % Blüherfolg zu erreichen, bei sieben LT ist die Induktion vollständig; LANG u. MELCHERS (1943) konnten mit vier LT ~ 80 % Blütenbildung auslösen: Unser Pflanzenmaterial reagiert also offenbar photoperiodisch weniger empfindlich. Bei Dauerlicht erreichen wir allerdings schon bei zwei DLT eine hohe Induktionsrate (86 % Blütenbildung), während die Ergebnisse der zitierten Autoren hier noch unter dem Schwellenwert der Induktion liegen; ab drei DLT sind jedoch deren und unsere Ergebnisse identisch (nämlich fast 100%ige Blütenbildung).

Die Störlichtversuche variierten je nach Lichtqualität: Gaben wir zwischen der 17. und 18 $\frac{1}{2}$. Stunde normales Weißlicht, so resultierte bei unseren Pflanzen daraus erst nach sieben SLT eine minimale Induktion (unter 10 %), die dann jedoch rasch zunimmt; rund 1 $\frac{1}{2}$ Stunden Standard-Hellrot in der Mitte der Dunkelphase erwiesen sich jedoch überraschenderweise als nicht auslösend (die eine Pflanze bei sieben SLT ist wohl eine Ausnahme!). Es sieht demnach so aus, als ob hierbei die NER mit der HER kollidiert, also das 1 $\frac{1}{2}$ stündige HR-Störlicht nicht im Sinne eines Störlichts, sondern als Verlängerung der Hauptlichtperiode wirkt. Eine Interpretation auf Grund der gängigen Hypothesen, vor allem der angenommenen Einstellung eines photostationären Gleichgewichtes im Phytochromsystem zwischen dem HR- und DR-Pigment (MOHR 1970; SCHOPFER 1970, unveröffentl.), macht die Annahme fraglich, daß das Phytochromsystem als alleiniger Akzeptor für die Photoregulation der Blütenbildung bei *Hyoscyamus* niger zuständig sei. Eingehende Untersuchungen zu diesem Komplex sind geplant.

2. Behandlung der Pflanzen mit Cycloheximid

Die gegensätzlichen Befunde über die Wirkung von Antimetaboliten auf die photoperiodisch induzierte Blütenbildung, vor allem aber die Ergebnisse von EICHHOFF u. RAU 1969, daß 2-Thiouracil — auf den Vegetationspunkt appliziert — eine Hemmung, in ausgewachsene Blätter infiltriert jedoch eine Induktion der Blütenbildung hervorruft, bildeten den Hintergrund unserer Untersuchungen zur Wirkungsweise des Proteinsynthesehemmstoffs Cycloheximid auf die Blütenbildung.

Cycloheximid (= Actidion) ist ein Antibiotikum, das von *Streptomyces griseus* u. *noursei* erzeugt wird und folgende Struktur hat (nach RAUEN):



Seit KERRIDGE 1958 als erster die hemmende Wirkung von CH an Hefen festgestellt hatte, wurde dieser Effekt von mehreren Arbeitsgruppen näher untersucht. Heute gilt CH allgemein als spezifisches Proteinsynthesegift, dessen Angriffsort bei der Translokasereaktion an 80 S Ribosomen angegeben wird; der Hemmeffekt ist in vitro durch GTP revertierbar (u. a. BALIGA, COHEN a. MUNRO 1970).

Über den Einfluß von CH auf die Blütenbildung wurde in der Literatur bisher noch nicht berichtet.

a) Infiltration von Cycloheximid in Blätter unter KT-Bedingungen

Die Pflanzen wurden nach der im Kapitel B/II/1 beschriebenen Weise präpariert; die Infiltration erfolgte zwischen der 4. und 8. Stunde nach Lichtbeginn; danach erhielten die Versuchspflanzen weiterhin bis zur Auswertung KT-Bedingungen.

In Vorversuchen hatten wir die Verträglichkeit der Blätter für die verschiedenen CH-Konzentrationen getestet. Bei Konzentrationen unter 10^{-5} m CH konnten wir dabei keine äußerlich wahrnehmbaren Schäden am Blatt feststellen. Bei Konzentrationen zwischen 10^{-5} m CH und $3 \cdot 10^{-5}$ m CH konnten folgende Reaktionen registriert werden: Schlaffwerden der Blätter nach durchschnittlich fünf Tagen, danach leichtes Angilben und Auftreten von punktförmigen gelben bis bräunlichen Flecken; drei bis vier Wochen später waren alle behandelten Blätter abgestorben. Zu diesem Zeitpunkt hatten aber die aus den Primordien nachgewachsenen Blätter schon ca. 2–5 cm² Spreitenfläche erreicht; nach LANG u. MELCHERS genügt das, um voll photoperiodisch reagieren zu können. Bei Konzentrationen zwischen $5 \cdot 10^{-5}$ m und 10^{-4} m CH trat nach wenigen Tagen Gelbfärbung der Blätter mit eingelagerten dunkelgrünen Blättinseln auf und nach ca. zehn Tagen waren diese Blätter fast vertrocknet.

Die aus den bei der Infiltration vorhandenen Primordien nachwachsenden Blätter unterschieden sich in einigen Merkmalen von unbehandelten KT-Kontrollen. Ihr Aussehen ist in Abb. 2 dargestellt.

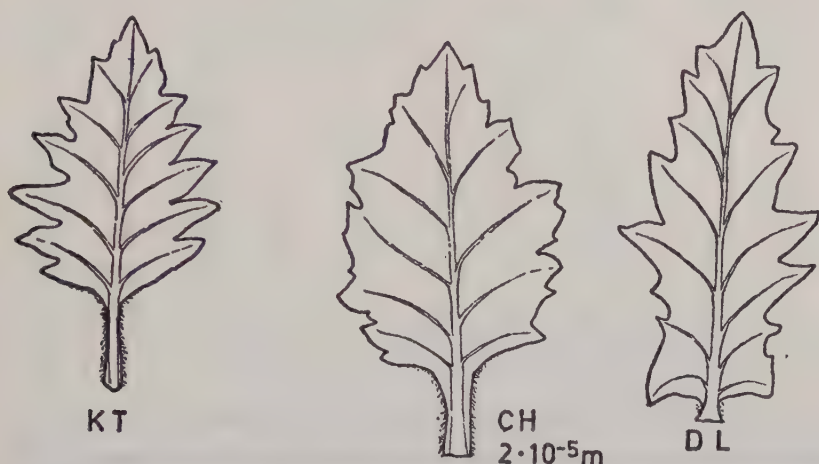


Abb. 2: Habitus der Blätter, die aus den bei CH-Infiltration vorhandenen Primordien hervorgegangen sind. Zum Vergleich: Blatthabitus unter KT- und DL-Bedingungen.

Die Blattfläche ist bei $2 \cdot 10^{-5}$ m CH im Vergleich zum KT-Blatt etwas gewellt, die Ränder erscheinen nicht so stark ausgebuchtet, Blattoberseite und Stiel sind stärker behaart, der Stiel ist kürzer, die Spreite zieht sich weit am Stiel entlang; die meisten dieser Merkmale treffen auch für das unter DLT gebildete Blatt zu — sie sind kennzeichnend für Blätter blühender Pflanzen.

Die wasserinfiltrierten Blätter der KT-Kontrollen zeigen keine Schäden; bei der Auswertung nach sechs Wochen waren sie meist noch voll intakt.

Die Auswertung der mit Cycloheximid infiltrierten Pflanzen in bezug auf die Blühinduktion ergab die in Tab. 2 wiedergegebenen Effekte. Der optimale Blüherfolg wird demnach erreicht, wenn die Infiltrationslösung zwischen 10^{-5} m und $5 \cdot 10^{-5}$ m CH enthält. Dabei erwiesen sich $2 \cdot 10^{-5}$ m und $3 \cdot 10^{-5}$ m bei $2\frac{1}{2}$ bis vier Monate alten Pflanzen als die wirksamsten Konzentrationen; sie induzierten eine Blütrate von fast 60 %; eine Förderung über diesen Wert hinaus konnte mit CH nicht

Tab. 2: Blütenbildung im KT durch einmalige Infiltration der Blätter mit Cycloheximid verschiedener Konzentrationen. Alter der Pflanzen 2¹/₂ bis vier Monate.

Konzentration Cycloheximid Mol/l	Vers.- pflanzen	Aus- wertbar	Blühend			Vegetativ		
			Zahl	%	Blatt- zuwachs	Zahl	%	Blatt- zuwachs
H ₂ O	96	92	0	0	—	92	100	31
5 · 10 ⁻⁶	40	39	3	8	8	36	92	25
10 ⁻⁵	114	103	55	54	7	48	46	26
2 · 10 ⁻⁵	100	91	53	59	9	38	41	24
3 · 10 ⁻⁵	80	65	37	57	10	28	43	26
5 · 10 ⁻⁵	64	45	19	42	9	26	58	23
10 ⁻⁴	16	6	0	0	—	6	100	22

erzielt werden. Eine mögliche Erklärung ergibt sich aus den durch CH-Infiltration verursachten, schon beschriebenen Deformationen an den in der ersten Zeit nachwachsenden Blättern. Diese Abweichungen im äußeren Habitus zeigen, daß CH auch dann direkt oder indirekt am Vegetationspunkt einwirkt, wenn es ausschließlich in die Blätter infiltriert wurde. Die Vermutung lag nahe, daß CH neben einer blühfördernden Wirkung in den Blättern einen Hemmeffekt am Vegetationspunkt ausübt.

Als weiteres Ergebnis dieser Versuchsserien erhielten wir eine Verschiebung der Sensibilität für die induzierende Wirkung von CH mit dem Alter der Pflanzen (Abb. 3).

Bei jüngeren Pflanzen (ungefähr 2¹/₂ bis vier Monate alt) genügen die CH-Konzentrationen zwischen 10⁻⁵ m und 3 · 10⁻⁵ m zur optimalen Auslösung der Blütenbildung. Sind die Pflanzen zur Zeit des Versuchsansatzes jedoch zwischen vier und sechs Monate alt, so verschiebt sich das Induktionsmaximum deutlich zur höheren Konzentration (5 · 10⁻⁵ m CH); der Gipfel ist außerdem stärker ausgeprägt und spezifischer. Ein Grund für diese Verschiebung könnte eine mit steigendem Alter verminderte Aufnahme von Lösungen durch Infiltration sein; dies wurde durch vergleichende Gewichtsmessungen nachgeprüft (Tab. 3).

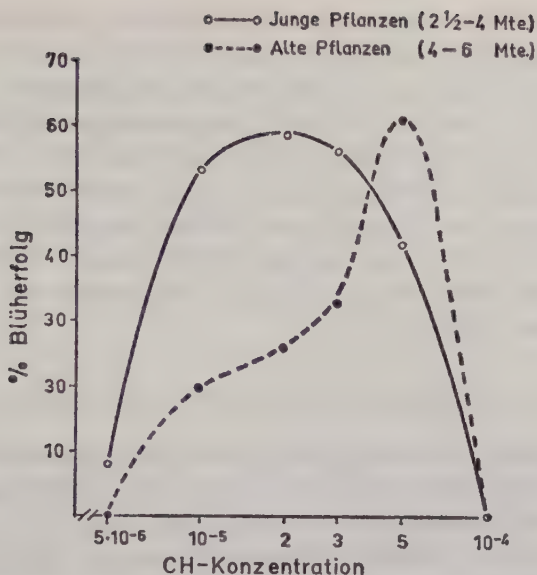


Abb. 3: Blühinduktion im KT durch CH in Abhängigkeit vom Alter der Pflanzen.

Tab. 3: Gewichtszunahme der Blätter durch Infiltration in Abhängigkeit vom Pflanzenalter.

Gewicht	20 Blätter 2 1/2 Monate alt	20 Blätter 4 1/2 Monate alt
vor Infiltration	26,27 g	24,44 g
nach Infiltration	43,18 g	39,68 g
Gewichtszunahme	164,0 ‰	162,5 ‰
Gewicht 1/2 Std. nach Infiltration	150,5 ‰	148,0 ‰
Gewicht 2 1/2 Std. nach Infiltration	132,0 ‰	127,0 ‰

Sowohl die Aufnahme als auch die Verdunstung der Infiltrationslösung war innerhalb der Fehlergrenze gleich; das Alter der Pflanzen hat demnach keinen Einfluß auf die Gewichtszunahme durch Infiltration. Dieses Ergebnis sagt allerdings noch wenig über die tatsächliche Auf-

nahme in die Zelle selbst aus, weil durch Infiltration die Lösung fast ausschließlich in die Interzellularen gedrückt wird. Von hier aus erfolgt dann erst die effektive Aufnahme der gelösten Substanz in die Zelle selbst und diese war mit unserer Versuchsanordnung nicht meßbar. So kommen als Erklärungsmöglichkeiten für die bei älteren Pflanzen zur Blühauslösung benötigten höheren CH-Konzentrationen u. a. die mit steigendem Alter abnehmende Stoffwechselaktivität — wodurch höhere Giftkonzentrationen weniger effektiv würden — sowie die zu beobachtende allgemein ansteigende Widerstandskraft gegenüber Außenfaktoren in Frage.

b) Applikation von Cycloheximid auf den Vegetationspunkt

Da eine Infiltration von CH in die Blätter bei *Hyoscyamus niger* nur bis zu maximal 60 % Blütenbildung induziert, lag die Vermutung nahe, daß neben einer fördernden auch eine hemmende Wirkung dieses Stoffes zu verzeichnen ist. Solche von Antimetaboliten am Vegetationspunkt verursachten Hemmeffekte auf die photoperiodisch induzierte Blütenbildung sind vielfach festgestellt worden (siehe Einleitung).

Es wurde deshalb die Wirkung einer selektiven Applikation von CH auf den Vegetationspunkt untersucht; sie erfolgte mittels getränkter Wattebäusche oder durch über den Vegetationskegel gestülpte Glasröhrchen. Die Konzentration von CH betrug hierbei 10^{-5} m, die Versuchsdauer lag bei drei oder sieben Tagen.

Mehrmaliger Wechsel der Lösung und vor allem der Wattebäusche (wegen starker Verdunstung des Wassers!) sorgte für einigermaßen gleichmäßige Konzentration des Giftes. Während dieser Behandlung waren die Pflanzen verschiedenen photoperiodischen Bedingungen ausgesetzt. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

Die Werte zeigen, daß selektiv auf den Vegetationspunkt gegebenes CH im KT keine Induktion hervorruft. Bei 3 DLT — also voll induktiven Bedingungen — zeigt sich deutlich eine Hemmung der Photoinduktion durch das auf den Vegetationspunkt applizierte CH; sie ist nicht vollständig, was aber wahrscheinlich auf eine zu geringe CH-Konzentration zurückzuführen ist. Die Verhältnisse bei den Störlichtversuchen sind wegen der geringen Induktion der Kontrolle (nur 10 % Blüherfolg) nur bedingt aussagekräftig, lassen aber die gleiche Tendenz erkennen.

Tab. 4: Applikation von 10^{-5} m Cycloheximid auf den Vegetationspunkt bei verschiedener photoperiodischer Behandlung. Abkürzungen siehe Tab. 1.

Bedingungen	Vers.- pflanzen	Aus- wertbar	Blühend			Vegetativ		
			Zahl	%	Blatt- zuwachs	Zahl	%	Blatt- zuwachs
3 KT H ₂ O auf Vegpkt	10	7	0	0	—	7	100	25
3 KT CH auf Vegpkt	10	7	0	0	—	7	100	23
7 KT H ₂ O auf Vegpkt	16	11	0	0	—	11	100	18
7 KT CH auf Vegpkt	30	15	0	0	—	15	100	16
3 DLT H ₂ O auf Vegpkt	10	9	9	100	6	0	0	—
3 DLT CH auf Vegpkt	20	16	10	63	7	6	37	22
7 LTS _w H ₂ O auf Vegpkt	10	10	1	10	9	9	90	19
7 LTS _w CH auf Vegpkt	20	11	0	0	—	11	100	17

c) Simultane Behandlung des Vegetationspunktes und der Blätter mit Cycloheximid

Die eben beschriebene selektive Wirkung von CH auf die Blütenbildung sollte noch durch eine kombinierte Behandlung der beiden von dem Proteinsynthesegift gegensätzlich beeinflussten Wirkungsorte gestützt werden. CH wurde deshalb gleichzeitig sowohl in die Blätter infiltriert als auch auf den Vegetationspunkt appliziert. Die CH-Konzentration betrug jeweils $2 \cdot 10^{-5}$ m; die Ergebnisse sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

Bei den im KT gehaltenen Pflanzen hemmt CH im Vegetationspunkt die durch gleiche CH-Konzentration ausgelöste Blühinduktion in den Blät-

tern, allerdings nicht vollständig. Demgegenüber fällt die Blütrate bei 3 DLT mit CH in Blättern und Vegetationspunkt mit 62 % zu niedrig aus, wenn man bedenkt, daß 3 DLT alleine 100 %ig auslösen und CH in Blättern bei CH auf Vegetationspunkt (siehe 3-KT-Kontrolle) für sich einen kleinen aber positiven Wert ergeben (16 %), so daß als Gesamtergebnis volle Induktion resultieren müßte.

Bemerkenswert ist auch der andere bei DL zu beobachtende Effekt: Die Konzentration 10^{-5} m CH auf dem Vegetationspunkt (Tab. 4) löst bei 3-DLT-Photoinduktion eine gleich große Hemmung aus wie $2 \cdot 10^{-5}$ m CH auf dem Vegetationspunkt mit 3 DLT und zusätzlich induktiven $2 \cdot 10^{-5}$ m CH in den Blättern: beide etwa 60 % Blüherfolg, d. h. die erhöhte Konzentration an CH am Vegetationspunkt bewirkt eine erhöhte Hemmung, die jedoch durch die mittels CH-Infiltration in die Blätter induzierte Blütenbildung weitgehend kompensiert wird.

Bei den mit Störlicht und zusätzlicher CH-Infiltration in die Blätter induzierten Pflanzen wird die sowieso schon schwache Blütenbildung durch CH am Vegetationspunkt vollständig gehemmt.

Tab. 5: Gleichzeitige Behandlung der Blätter und des Vegetationspunktes mit $2 \cdot 10^{-5}$ m CH bei zusätzlicher Variation der photoperiodischen Bedingungen. Abkürzungen siehe Tab. 1, Kontrollen siehe Tab. 4.

Bedingungen	Vers.- pflanzen	Aus- wertbar	Blühend			Vegetativ		
			Zahl	%	Blatt- zuwachs	Zahl	%	Blatt- zuwachs
3 KT								
CH in Blätter	16	12	6	50	7	6	50	23
H ₂ O auf Vegpkt								
3 KT								
CH in Blätter	36	25	4	16	6	21	84	20
CH auf Vegpkt								
3 DLT								
CH in Blätter	16	13	8	62	5	5	38	13
CH auf Vegpkt								
7 SLT _w								
CH in Blätter	20	11	0	0	—	11	100	16
CH auf Vegpkt								

d) Additive Wirkung von Cycloheximid-Infiltration und Dauerlicht

Auf Grund der bisherigen Befunde war es notwendig, zu prüfen, inwieweit sich die Auslösung der Blütenbildung durch CH und die Photoinduktion addieren bzw. beeinflussen.

Bei diesen Versuchsreihen wurden die induzierenden Faktoren sukzessive an aufeinanderfolgenden Tagen gegeben, und zwar Lichtinduktion und CH-Induktion getrennt an verschiedenen Tagen. So bedeutet z. B. 1 DLT + CH: am 1. Tag Dauerlicht, am 2. Tag CH-Infiltration; bzw. CH + 2 DLT: am 1. Tag CH-Infiltration, die beiden folgenden Tage Dauerlicht. Die CH-Konzentration betrug $2 \cdot 10^{-5}$ m.

Tab. 6: Additive Wirkung von Cycloheximid und Dauerlicht. Die induzierenden Faktoren wurden nacheinander gegeben. CH-Konzentration: $2 \cdot 10^{-5}$ m. Weitere Erklärungen im Text.

Bedingungen	Vers.- pflanzen	Aus- wertbar	Blühend			Vegetativ		
			Zahl	%	Blatt- zuwachs	Zahl	%	Blatt- zuwachs
CH $2 \cdot 10^{-5}$ m	8	7	3	43	9	4	57	23
1 DLT	10	10	0	0	—	10	100	21
1 DLT + H ₂ O	20	20	0	0	—	20	100	23
1 DLT + CH	24	21	15	72	5	6	28	23
CH + 1 DLT	16	11	6	55	5	5	45	18
2 DLT	10	10	9	90	8	1	10	22
2 DLT + CH	16	14	14	100	6	0	0	—
CH + 2 DLT	16	14	14	100	8	0	0	—
3 SLT _w	8	8	0	0	—	8	100	16
CH + 3 SLT _w	16	15	12	80	8	3	20	22
7 SLT _w	8	8	0	0	—	8	100	18
CH + 7 SLT _w	16	14	14	100	7	0	0	—

Die Ergebnisse der Tabelle 6 zeigen eine einwandfreie Addition der beiden induzierenden Faktoren Licht und CH, wenn sie über das Blatt einwirken. Dabei spielt es bei starker Induktion offensichtlich keine Rolle, ob zuerst Lichtinduktion und dann CH-Stimulierung oder umgekehrt gegeben wird. Lediglich bei unerschwelligen Lichtinduktionen differieren die Werte: 1 DLT + CH induziert eine höhere Blütrate als

CH + 1 DLT; man könnte hier an eine durch das CH verursachte Vergiftung des Stoffwechsels denken, durch die die Lichtgabe nur vermindert wirksam ist. Die gefundenen Abweichungen erlauben allerdings keine definitiven Rückschlüsse.

Auch Störlicht-Bedingungen lösten zusammen mit CH-Infiltration eine erstaunlich hohe Blütenbildung aus. Vergleicht man 1 DLT + CH bzw. CH + 1 DLT mit CH + 3 SLT, so ist zu erkennen, daß die mit 3 SLT erzielten Induktionswerte genau wie die mit 1 DLT für sich alleine zwar noch unterhalb des Schwellenwertes der Blühauslösung liegen (darauf deuten auch die zahlreichen erhöhten Vegetationskegel hin; vgl. LANG u. MELCHERS 1943), mit CH aber quantitativ und „qualitativ“ additiv wirken bzw. einander aktivieren, wie die Blüherfolge beweisen: 72 % bzw. 55 % und 80 % gegenüber 43 % der CH-Kontrolle. Das Verhältnis der Blühraten von CH + 1 DLT und CH + 3 SLT (55 % zu 80 %) zeigt außerdem, daß 3 SLT für sich eine etwas stärkere – wenn auch noch unterschwellige – Photoinduktion bewirken als 1 DLT allein; damit können wir zudem die bei den Pfropfversuchen festgestellte Quantisierbarkeit des Blühstimulus bestätigen (vgl. Zusammenfassung LANG 1961).

Bei 7 SLT dürfte die Photoinduktion sehr nah am Schwellenwert liegen, da zusammen mit CH-Infiltration nun 100%ige Auslösung der Blütenbildung zu erreichen ist.

Unsere Versuchsergebnisse erlauben den Schluß, daß zwischen Photoinduktion und CH-Induktion eine Wechselbeziehung im Sinne einer Summierung der Blühstimuli oder aber einer gegenseitigen Aktivierung besteht. Außerdem wurde erstmals gezeigt, daß auch unterschwellige Photoinduktionen bei entsprechender Versuchsanordnung in Form von Blühraten erfaßt werden können.

e) Additive Wirkung von Cycloheximid- und 2-Thiouracil-Infiltration

EICHHOFF u. RAU (1969) hatten mit 2-TU-Infiltration in die Blätter von *Hyoscyamus niger* bis zu 87 % Blütenbildung auslösen können, obwohl andererseits 2-TU im Vegetationspunkt als Hemmstoff dieses Prozesses wirkte.

In der Literatur wird 2-TU als wirksamer Hemmstoff vieler Entwicklungsprozesse beschrieben, so z. B. der Samenkeimung (SHIMENO a. KINO-

SHITA 1963; KHAN 1966, 1967), des Wachstums (GUILLOT 1965), der Anthocyansynthese (MOHR u. SENF 1966); seine Wirkung über die Blätter auf die Blütenbildung ist jedoch weniger klar.

Nach HESS (1959) und HESLOP-HARRISON (1960) wird 2-TU in die RNS der Blätter höherer Pflanzen eingebaut; beide Autoren erhielten dabei eine Hemmung der Blütenbildung. Dagegen konnten WARDELL und SKOOG (1969) u. a. mit 2-TU bei Tabak eine erhöhte Anzahl von Blütenknospen erzielen.

Um eine eventuelle additive Induktionswirkung von CH und 2-TU zu erfassen (und um möglicherweise Ansatzpunkte über die Wirkungsorte beider Antimetabolite zu erhalten), wählten wir zweierlei Versuchsbedingungen.

An einigen Pflanzen wurden bei der Präparation vier bis sechs Blätter belassen; in zwei bis drei Blätter wurde CH, in die übrigen zwei bis drei Blätter 2-TU infiltrierte. Anderen Pflanzen beließen wir drei bis vier Blätter; die Infiltration erfolgte zuerst mit dem einen Antimetabolit und nach dem Austrocknen wurde in dieselben Blätter der zweite Inhibitor infiltrierte. Der pH-Wert der 2-TU-Lösung lag bei acht.

Die jeweiligen Konzentrationen betrugen $2 \cdot 10^{-5}$ m CH und 10^{-3} m 2-TU. Die Werte sind der Tab. 7 zu entnehmen.

Tab. 7: Additive Wirkung von CH und 2-TU auf die Blühinduktion bei je einmaliger Infiltration im KT. Konzentrationen: CH $2 \cdot 10^{-5}$ m; 2-TU 10^{-3} m.

Bedingungen	Vers.- pflanzen	Aus- wertbar	Blühend			Vegetativ		
			Zahl	%	Blatt- zuwachs	Zahl	%	Blatt- zuwachs
2-TU 10^{-3} m	18	17	9	53	11	8	47	18
CH $2 \cdot 10^{-5}$ m	8	8	3	38	10	5	62	19
2-3 Bl.: 2-TU	16	11	7	64	6	4	36	17
2-3 Bl.: CH								
3-4 Bl.:	16	12	8	67	8	4	33	18
CH + 2-TU								
2-TU + CH								

Obwohl von den mitgeführten Kontrollen der CH-Wert verhältnismäßig niedrig lag (im Mittel schwankte er sonst zwischen 50 und 60 %), er-

gibt sich keine numerische Addition der Blüherfolge von CH und 2-TU. Allerdings beeinflussen sich die beiden Antimetabolite insofern, als beide zusammen eine höhere Blüherate ergeben als jeder für sich. Dabei spielt es keine Rolle, ob sie die Reaktion in ein und demselben Blatt oder in verschiedenen Blättern einer Pflanze auslösen.

f) Mehrmalige Infiltration von Cycloheximid

Da sich die Induktionswirkungen mehrerer Photoperioden addieren können, und EICHHOFF u. RAU (1969) mit 2-TU bei mehrmaligen Infiltrationen an aufeinanderfolgenden Tagen z. T. beträchtliche Zunahmen der Blüheraten erreichten, sollte dieser Effekt mit CH ebenfalls untersucht werden.

Dazu wurden die Pflanzen in Versuchsgruppen geteilt und an vier aufeinanderfolgenden Tagen täglich je einmal mit CH-Lösung verschiedener Konzentration, die Kontrollen mit Wasser, infiltriert.

Tab. 8: Mehrmalige Infiltration der Blätter mit CH im KT. Die Pflanzen wurden an aufeinanderfolgenden Tagen täglich je einmal mit CH verschiedener Konzentration infiltriert.

CH-Konz. [m]	Anzahl Infiltr. Cyclen	Vers.- pflanzen	Aus- wertbar	Blühend			Vegetativ		
				Zahl	%	Blatt- zuwachs	Zahl	%	Blatt- zuwachs
H ₂ O	2	9	9	0	0	—	9	100	30
	4	16	15	0	0	—	15	100	27
5 · 10 ⁻⁶	1	24	23	3	13	9	20	87	25
	2	24	24	1	4	12	23	96	25
	3	32	28	0	0	—	28	100	26
	4	16	14	1	7	15	13	93	29
10 ⁻⁵	1	56	48	24	50	7	24	50	23
	2	52	43	16	37	6	27	63	24
	3	48	37	11	30	6	26	70	23
	4	32	26	10	39	7	16	61	21
2 · 10 ⁻⁵	1	24	21	15	72	7	6	28	21
	2	16	12	5	42	6	7	58	25
	3	16	8	2	25	5	6	75	19
	4	8	6	1	17	12	5	83	19

Diese Prozedur schädigt zwar die Blätter, vor allem die der „vergifteten“ Pflanzen; sie blieben aber doch mindestens 14 Tage lang an der Pflanze einigermaßen intakt und starben erst danach langsam ab; zu diesem Zeitpunkt hatten sich jedoch die Primordien zu photoperiodisch voll aktiv reagierenden Blättern entwickelt (vgl. LANG u. MELCHERS 1943). In Tab. 8 sind die Ergebnisse zusammengestellt.

Der größere Ausfall an Versuchspflanzen nach drei- bis viermaliger Infiltration bei den höheren CH-Konzentrationen beweist eine gewisse Schädigung durch das Proteinsynthesegift.

Die Blüherfolge zeigen eindeutig, daß mehrmalige Infiltration bei allen CH-Konzentrationen die Blühinduktion im Vergleich zu der nach einmaliger Applikation herabsetzt. Daneben treten im vegetativen Bereich starke Schäden auf: Die Pflanzen sind im Gesamthabitus kleiner, und auch der Blattzuwachs nimmt bei höheren Konzentrationen etwas ab. Auffallend ist, daß bei den niedrigen CH-Konzentrationen ($5 \cdot 10^{-6}$ m und auch 10^{-5} m) die Blühinduktion nach dreimaliger Infiltration relativ am niedrigsten liegt, während die viertägige Behandlung wieder etwas höhere Blühraten ergibt — sie jedenfalls keineswegs weiter herabdrückt. Nun haben Revertierungsversuche der Blühinduktion von EICH-HOFF u. RAU (1969) — Revertierung des 2-TU-Induktionseffektes durch Uracil — ergeben, daß der eigentliche Induktionsvorgang nach ca. drei Tagen abgeschlossen ist, daß also nur bis zum 3. Tag eine Beeinflussung der ausgelösten Blühinduktion im Blatt möglich ist. Für die Mehrfachinfiltration könnte das bedeuten, daß in den ersten drei Tagen der infiltrierte Antimetabolit seine eigene Induktion so beeinflußt, daß die Stimulierung abgeschwächt wird, während eine Infiltration von CH zu einem späteren Zeitpunkt erneut initiieren könnte.

Diese Vermutung sollte in der nächsten Versuchsreihe geprüft werden, indem zwischen die Infiltrationen verschieden lange Pausen eingeschoben wurden.

Die Ergebnisse (Tab. 9) zeigen bei 10^{-5} m CH für die erst am 3. Tag erfolgte zweite Infiltration keine Änderung der Blührate (also hier keine Addition von Hemmeffekten wie bei der vorigen Versuchsreihe); nach einer zweitägigen Infiltrationspause ist sogar eine leichte Steigerung der Blüherfolge zu erkennen, wenngleich die Unterschiede nicht gravierend sind. Vergleicht man jedoch die Werte aus Tab. 8 und 9,

so ergibt sich klar, daß 10^{-5} m CH bei zweitägiger Pause zwischen den Infiltrationen eine leichte Steigerung der Blühhrate verursacht, während tägliche Aufeinanderfolge der Behandlung einen hemmenden Einfluß ausübt.

Tab. 9: Mehrmalige Infiltration von CH 10^{-5} m im KT mit verschiedenen langen Infiltrationspausen.

Konz. CH [m]	Tag der Infiltr.	Vers.- pflanzen	Aus- wertbar	Blühend			Vegetativ		
				Zahl	%	Blatt- zuwachs	Zahl	%	Blatt- zuwachs
H ₂ O	1. + 4.	8	8	0	0	—	8	100	25
10^{-5}	1.	24	23	17	74	7	6	26	23
	1. + 3.	32	30	22	73	7	8	27	22
	1. + 4.	32	27	22	82	5	5	18	19

g) Infiltration eines Teiles der Blätter mit Cycloheximid

Die in der Einleitung erwähnte Hypothese, daß nichtinduzierte Blätter einen Blühhemmstoff produzieren, müßte mit Hilfe einer teilweisen Infiltration und durch abgestuft induktive Konzentrationen von CH zu prüfen sein. Bei der Präparation beließen wir in diesem Versuchsansatz nicht nur wie bisher drei, sondern sechs ausgewachsene Blätter an der Pflanze. Von diesen sechs Blättern wurden drei im KT einmalig mit CH, die übrigen drei nicht infiltriert.

Tab. 10: Blühinduktion im KT bei einmaliger Infiltration eines Teils der Blätter mit CH. Die Vergleichswerte (alle Blätter infiltriert) stammen aus Tab. 2.

Behandlung der Blätter			Vers.- pflanzen	Aus- wertbar	Blühend		Vegetativ	
Blatt- zahl pro Pflanze	Davon mit CH infiltr.	Konz. an CH			Zahl	%	Zahl	%
6	3	H ₂ O	12	11	0	0	11	100
6	3	$2 \cdot 10^{-5}$	56	45	18	40	27	60
3	3	$2 \cdot 10^{-5}$	100	91	53	59	38	41
6	3	$5 \cdot 10^{-5}$	56	43	27	63	16	37
3	3	$5 \cdot 10^{-5}$	64	45	19	42	26	58
6	3	10^{-4}	24	17	7	41	10	59
3	3	10^{-4}	16	6	0	0	6	100

Die in Tab. 10 zusammengefaßten Ergebnisse lassen folgende Aussagen zu:

Die optimale Blüßrate bei Infiltration aller oder nur der Hälfte der Blätter einer Pflanze mit CH bleibt gleich hoch (um 60 %). Allerdings hat sich die Konzentration für die optimale Blühinduktion verschoben; sie liegt bei „teilweiser“ CH-Behandlung nicht bei $2 \cdot 10^{-5}$ m CH (wie bei „vollständiger“ Infiltration), sondern bei $5 \cdot 10^{-5}$ m CH (verdeutlicht in Abb. 4).

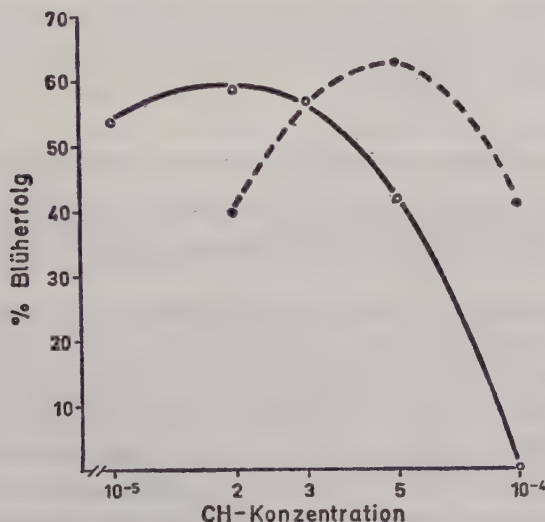


Abb. 4: Blühinduktion im KT bei Infiltration der Hälfte der Blätter einer Pflanze mit CH.

- — — ● CH in die Hälfte der Blätter einer Pflanze infiltriert
- — — ○ Kontrolle: CH in alle Blätter einer Pflanze infiltriert

Bei niedrigerer CH-Konzentration ($2 \cdot 10^{-5}$ m) ist mit teilweiser Infiltration die Blüßrate vermindert, und zwar von 59 % bei „vollständiger“ auf 40 % bei „teilweiser“ Infiltration; das könnte für einen leichten Hemmeffekt durch die unbehandelten Blätter sprechen. Die nach der Hemmstoffhypothese zu erwartende eindeutige Hemmwirkung durch die nicht induzierten Blätter ergibt sich jedoch nicht, wie die mit $5 \cdot 10^{-5}$ m und 10^{-4} m CH erhaltenen Werte zeigen. Es müßte nämlich dann bei $5 \cdot 10^{-5}$ m CH bei Infiltration nur eines Teils der Blätter von der bei Infiltration aller Blätter erhaltenen 42%igen Blüßrate noch eine

Hemmrate zu subtrahieren sein; das Gegenteil ist jedoch eingetreten: Wir erhalten eine Erhöhung, allerdings nur auf die für CH offensichtlich geltende Optimalrate (um 60 %).

Bei den mit 10^{-4} m CH erhaltenen Werten sind die Verhältnisse noch krasser: 0 % Blütrate bei Infiltration aller Blätter, 41 % bei Infiltration der Hälfte der Blätter! Diese 41%ige Blütrate entspricht den mit $5 \cdot 10^{-5}$ m CH bei Infiltration aller Blätter erzielten Werten. So liegt die Vermutung nahe, daß es sich hier um eine „Verdünnung“ des dem Blühstimulus entgegengesetzt wirkenden „Gifteffektes“ von CH durch die nicht infiltrierte bzw. nicht induzierten Blätter im Bereich des Vegetationspunktes handelt.

3. Atmung der Blätter unter verschiedenen induktiven Bedingungen

Wie aus der Literatur hervorgeht, ist verschiedentlich ein Zusammenhang zwischen Atmung und Blütenbildung gefunden und diskutiert worden.

So konnten LANG u. CLAES (1943) durch Hemmung der Atmung in der Dunkelphase bei *Hyoscyamus niger* Blütenbildung unter KT-Bedingungen auslösen. Davor war es schon LANG u. MELCHERS (1942) gelungen, durch Infiltration von Zuckerlösung (Saccharose) in *Hyoscyamus*-Blätter im KT Blütenbildung zu induzieren – allerdings nur dann, wenn diese Behandlung nahe der kritischen Tageslänge erfolgte. Die Autoren führen diese Effekte auf ein gesteigertes Angebot an Assimilaten für die Blühhormonproduktion zurück. EVANS (1962) gelang es dann, durch Stickstoffatmosphäre während der Dunkelperiode bei der LTP *Lolium temulentum* Blütenbildung im KT zu induzieren; er erklärt diesen Befund über einen im KT gebildeten Hemmstoff der Blütenbildung, der unter anaeroben Bedingungen nicht synthetisiert werden könne.

Abweichend davon berichtet CHAILAKHYAN (1968), daß Zusatzlicht während der Dunkelphase für die Blühinduktion von mehreren LTP (*Rudbeckia*, Hafer und Erbse) dann unwirksam ist, wenn es unter anaeroben Bedingungen gegeben wird; während es bei KTP (Sojabohne, Hirse, Cocklebur) unter gleichen Bedingungen stimuliert – d. h. Zusatzlicht ist in beiden Fällen unter anaeroben Bedingungen unwirksam.

EICHHOFF u. RAU fanden bei der Induktion der Blütenbildung mit 2-TU

einen Anstieg der O₂-Aufnahme durch die Blätter; er lag drei Tage nach der Infiltration um ca. 80 % über den Wasserkontrollen.

Diese Daten veranlaßten uns, zu untersuchen, ob bei der durch Licht oder Antimetabolite induzierten Blütenbildung eine Beeinflussung des dissimilatorischen Stoffwechsels zu verzeichnen ist.

a) Atmung der Blätter von *H. n.* nach Infiltration mit Cycloheximid

Von der Wirkung des CH auf die Atmung hat ROMANI (1968) berichtet, daß es bei isolierten Mitochondrien von Birnen- und Avocado-Früchten einen stimulierenden Einfluß auf die Sauerstoffaufnahme ausübt. Auch die von MAC DONALD a. ELLIS (1969) sowie ELLIS a. MAC DONALD (1970) veröffentlichten Ergebnisse zeigen z. T. die gleiche Tendenz: CH (1 µg/ml) erhöht die Sauerstoffaufnahme bei bestimmten Geweben, so z. B. bei Speichergeweben von Rüben, Karotten und roten Beeten, weniger jedoch bei Kartoffeln und Weizenwurzeln. Die Autoren diskutieren als Ursache für die verstärkte Atmung eine Entkopplerwirkung des CH; daneben fanden sie, daß CH die sogen. Altersatmung „einschaltet“, wodurch die Sauerstoffaufnahme wesentlich erhöht wird. Keinen dieser Effekte konnten sie jedoch bei Blattgeweben feststellen.

Wie wirken nun blüteninduzierende CH-Konzentrationen auf die Atmung der Blätter von *Hyoscyamus niger*?

aa) Sauerstoffaufnahme nach Infiltration von CH in Blattstücke von *Hyoscyamus niger* im Dauerdunkel

Um die Wirkung von CH auf isoliertes Blattgewebe messen zu können, wurden Blattstücke ausgestanzt, mit den entsprechenden CH-Lösungen infiltriert und in die Reaktionsgefäße einer Warburgapparatur eingelegt. Um Einflüsse der Photosynthese (vgl. „Assimilateeffekt“ durch zugeführte Kohlenhydrate, LANG u. MELCHERS 1942) und anderer lichtabhängiger Prozesse auszuschalten, erhielten die Blattstücke Dauerdunkel. Die pro 6 cm² Blattfläche aufgenommene Sauerstoffmenge ist in Abb. 5 dargestellt.

Die Sauerstoffaufnahme fällt demnach nach den am ersten Tag gemessenen höheren Werten auf einen für jede Bedingung verschiedenen,

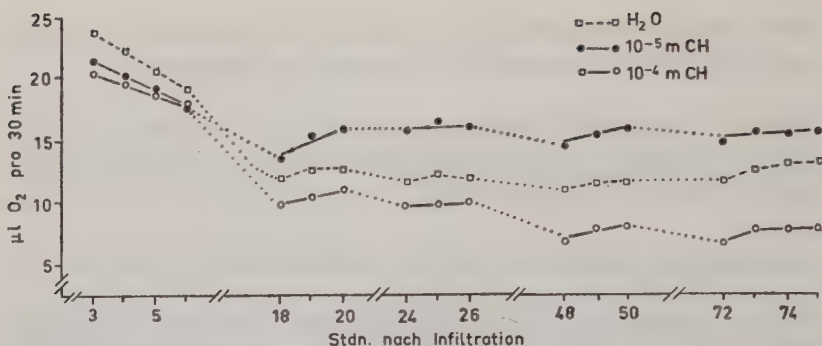


Abb. 5: Sauerstoffaufnahme von mit CH infiltrierten Blattstücken (6 cm²) im Dauerdunkel.

ungefähr konstanten Betrag ab; für die Wasserkontrolle beträgt er im Mittel 12 µl, bei 10⁻⁵ m CH um 15 µl und für 10⁻⁴ m CH um 8 µl Sauerstoff, bei letzterem mit fallender Tendenz.

Zunächst mußte jedoch geklärt werden, ob nicht schon die Infiltration allein eine Beeinträchtigung der Sauerstoffaufnahme verursacht. Dazu wurde die Atmung von Blattstücken unbehandelter sowie mit Wasser infiltrierter Pflanzen gemessen, bzw. miteinander verglichen. Der Infiltrationseffekt ist in Abb. 6 graphisch dargestellt.

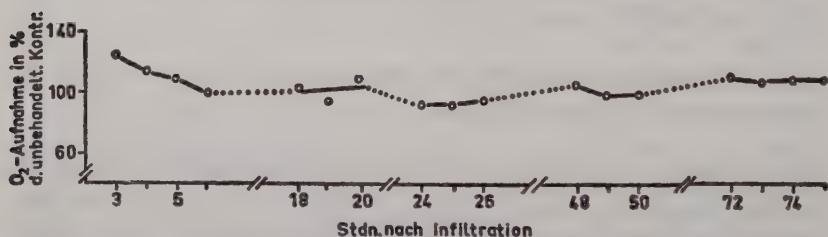


Abb. 6: Sauerstoffaufnahme wasserinfiltrierten Blattgewebes in % der unbehandelten Kontrollen im Dauerdunkel.

Wie der Kurvenverlauf erkennen läßt, liegt zwar die Atmungsintensität der wasserinfiltrierten Blattstücke gleich nach Infiltration um rund 20 % höher als die der unbehandelten Kontrollen, sie normalisiert sich dann aber innerhalb der nächsten drei Stunden. Als Ursache für diese anfängliche Steigerung kommen wahrscheinlich Wundatmung oder erhöhte

Atmung durch Wasserstreß in Frage. In den folgenden Tagen ergaben sich nämlich keine wesentlichen Unterschiede mehr; die Abweichungen lagen unter 10 % und damit innerhalb der Fehlergrenze. Um aber auch diese geringen Differenzen zu berücksichtigen, wurden die Werte der folgenden Versuche meist auf die Wasserkontrollen bezogen.

Die Kurvendarstellung der vorherigen Versuchsreihe (Abb. 5) in % der Wasserkontrolle zeigt Abb. 7.

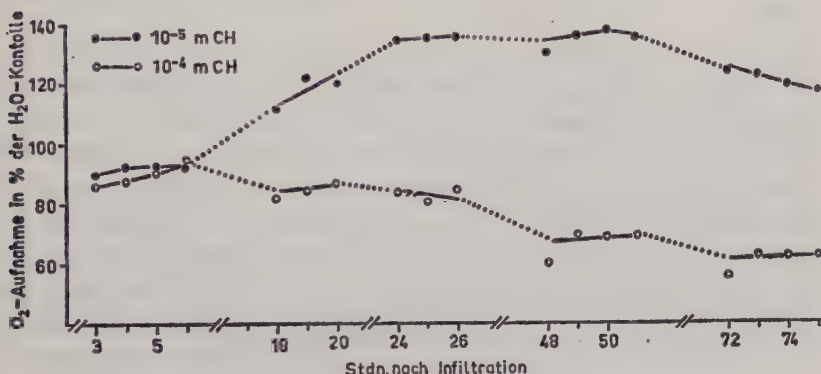


Abb. 7: Sauerstoffaufnahme von mit CH infiltrierten Blattstücken ($6 \text{ cm}^2 / 30 \text{ Min.}$) in % der Wasserkontrolle im Dauerdunkel.

Daraus ist zu ersehen, daß die Atmung in den ersten Stunden nach der Infiltration von CH allgemein geringfügig unter die der Kontrollwerte absinkt. An den folgenden Tagen ergeben sich für die beiden CH-Konzentrationen jedoch entgegengesetzte Effekte: Während 10^{-5} m CH eine rund 35%ige Steigerung der Sauerstoffaufnahme initiiert (die am 3. Tag etwas abklingt), ergibt 10^{-4} m CH eine deutliche, mit der Zeit noch zunehmende Hemmung bis zu fast 40 % (am 2. Tag) unter die Werte der Wasserkontrolle. Der während der gesamten Zeit gemessene RQ lag stets bei etwa eins, so daß eine Umschaltung auf Gärungsvorgänge weitgehend ausgeschlossen werden kann.

bb) Sauerstoffaufnahme von an der Pflanze reagierenden Blättern unter KT-Bedingungen nach Infiltration von Cycloheximid

Hatten wir im vorigen Versuch zur Vermeidung von Lichteinflüssen die

Blattstücke im Dauerdunkel gehalten, so sollte in der folgenden Versuchsreihe untersucht werden, wie CH auf die Atmung der an der Pflanze reagierenden Blätter im KT wirkt – unter jenen Bedingungen also, bei denen CH Blütenbildung induziert.

Dazu wurden täglich von im KT stehenden, mit CH infiltrierten Pflanzen Blattstücke jeweils in der Mitte der Lichtperiode ausgestanzt und von ihnen die Atmungsintensität nach der bisherigen Methode bestimmt.

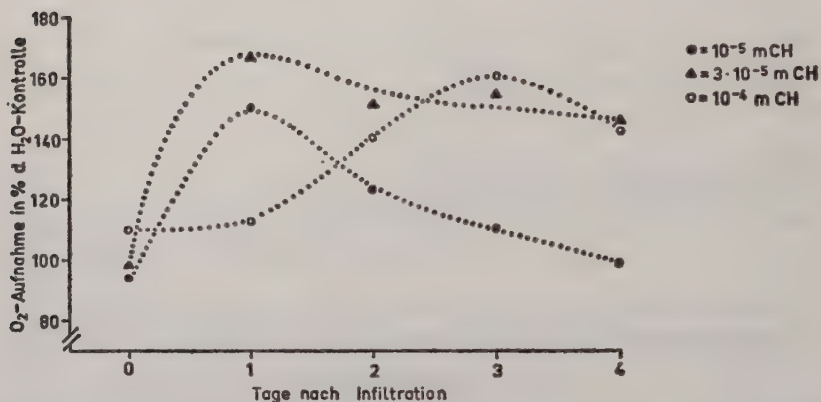


Abb. 8: Sauerstoffaufnahme von an der Pflanze reagierenden Blättern im KT nach CH-Infiltration. Der Tagesmittelwert ist in % der Wasserkontrolle aufgetragen.

Nach den in Abb. 8 aufgetragenen Werten ist in den ersten Stunden nach der Infiltration von CH keine bemerkenswerte Abweichung der Atmungsrate im Vergleich zur Wasserkontrolle festzustellen, wenn man von der rund 10%igen Steigerung durch 10⁻⁴ m CH absieht. In der Folgezeit, vor allem am 1. Tag nach Infiltration, ist durch 10⁻⁵ m und 3 · 10⁻⁵ m CH die Atmung stark erhöht (auf 50 % bzw. 65 %) und pendelt sich dann für 3 · 10⁻⁵ m CH in den nächsten Tagen auf 50%ige Atmungssteigerung ein, während sich die Werte bei 10⁻⁵ m CH der Wasserkontrolle nähern. Bei 10⁻⁴ m CH beginnt die starke Stimulierung der Sauerstoffaufnahme erst am 2. Tag nach Infiltration, erreicht am 3. Tag ihr Maximum (mit 60%iger Steigerungsrate) und nimmt dann langsam ab.

Der RQ lag bei diesen Versuchsreihen wiederum stets bei eins.

Nun kann man die beiden in Abb. 5 und 6 dargestellten Versuche nur bedingt vergleichen, weil ja zwei Parameter geändert wurden: isolierte Blattstücke im Dauerdunkel im einen Fall, an der Pflanze reagierende Blätter mit zehnstündiger Lichtgabe im anderen Fall. Trotzdem läßt sich erkennen, daß CH bestimmter Konzentrationen die Sauerstoffaufnahme fördert, unabhängig davon, ob es mit oder ohne Lichteinfluß einwirkt.

b) Sauerstoffaufnahme der Blätter von *Phaseolus multiflorus* nach Infiltration mit Cycloheximid

Die bei den bisherigen Versuchen festgestellten Änderungen der Atmungsintensität durch CH-Infiltration könnten auf einer direkten CH-Wirkung beruhen, sie könnten aber auch indirekt der Induktion der Blütenbildung zuzuschreiben sein. Es sollte deshalb durch Versuche mit einer tagneutralen Pflanze – deren Blühtermin nicht von der Tageslänge, sondern nur vom Erreichen eines bestimmten Entwicklungszustandes abhängt – in der nicht blühfähigen Phase geprüft werden, ob durch CH-Infiltration die Sauerstoffaufnahme verändert wird. Die Feuerbohne (*Phaseolus multiflorus*) genügt im Alter von ca. vier Wochen diesen Forderungen.

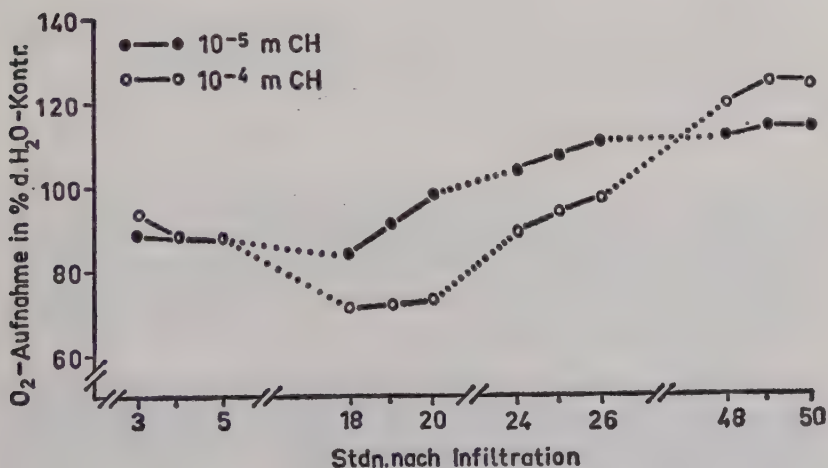


Abb. 9: Sauerstoffaufnahme von Blattstücken von *Phaseolus multiflorus* zu verschiedenen Zeiten nach CH-Infiltration (im Dauerdunkel). Werte in % der Wasserkontrolle.

In Abb. 9 ist die Sauerstoffaufnahme der ausgestanzt mit CH infiltrierten Blattstücke in % der Wasserkontrollen wiedergegeben; die Blattstücke wurden während der Versuchsreihe im Dauerdunkel gehalten. Die mittlere Sauerstoffaufnahme der Wasserkontrolle betrug bei den drei bis vier Wochen alten Bohnenblättern $14 \mu\text{l}$ Sauerstoff in 30 Min. pro 6 cm^2 Blattfläche. Von den im Vorversuch getesteten Konzentrationen erwiesen sich 10^{-4} m bis 10^{-5} m CH als die wirksamsten.

Während sofort nach Infiltration beide CH-Konzentrationen die Atmungsrate um ca. 10 % senkten, ist die Wirkung am folgenden Tag unterschiedlich: Bei 10^{-5} m ist eine leichte Steigerung, bei 10^{-4} m eine geringe Hemmung zu beobachten. Am Ende des ersten Tages und am zweiten Tag steigen die Werte beider CH-Konzentrationen an, so daß sie sichtbar über denen der Wasserkontrolle zu liegen kommen.

Zusätzliche Versuche an Blattscheiben von Phaseolus, die statt Dauerdunkel normale KT-Bedingungen erhielten, ergaben fast identische Kurven; daraus kann geschlossen werden, daß das Licht bei Bohnen (tagneutral!) keinen Einfluß auf die unter CH-Wirkung ablaufende Atmung hat, bzw. daß vermehrte Photosyntheseprodukte bei Phaseolus keine Steigerung der Atmung bewirken.

Eine andere Versuchsanordnung, bei der die Blätter an der Pflanze im 14stündigen Langtag reagierten und deren Atmung ebenfalls zu verschiedenen Zeiten nach CH-Infiltration gemessen wurde, ergab die in Abb. 10 dargestellten Werte.

10^{-4} m CH wirkt unter diesen Bedingungen während der ersten drei Tage durchwegs hemmend auf die Atmung, wobei sie sich jedoch am 2. Tag nach Infiltration der der Wasserkontrolle stark nähert. 10^{-5} m CH initiiert dagegen nach anfänglicher Hemmung eine geringe Förderung der Sauerstoffaufnahme von ca. 10 %.

Der Vergleich der Sauerstoffaufnahme von im Dauerdunkel gehaltenem Blattgewebe mit solchem, das im LT reagierte, ergibt für Phaseolus multiflorus keine entscheidenden Unterschiede.

Vergleicht man die bei Phaseolus und die bei Hyoscyamus erzielten Ergebnisse miteinander, dann zeigt sich, daß trotz gewisser vor allem

quantitativer Unterschiede CH auch in den Blättern von *Phaseolus multiflorus* keineswegs immer hemmend auf die Sauerstoffaufnahme wirkt, sondern im Gegenteil bei gewissen Konzentrationen zu einer leichten Stimulierung führt. Die weitaus höhere Steigerung der Sauerstoffaufnahme bei H. n. könnte jedoch auf mit der Induktion der Blütenbildung zusammenhängenden Vorgängen beruhen.

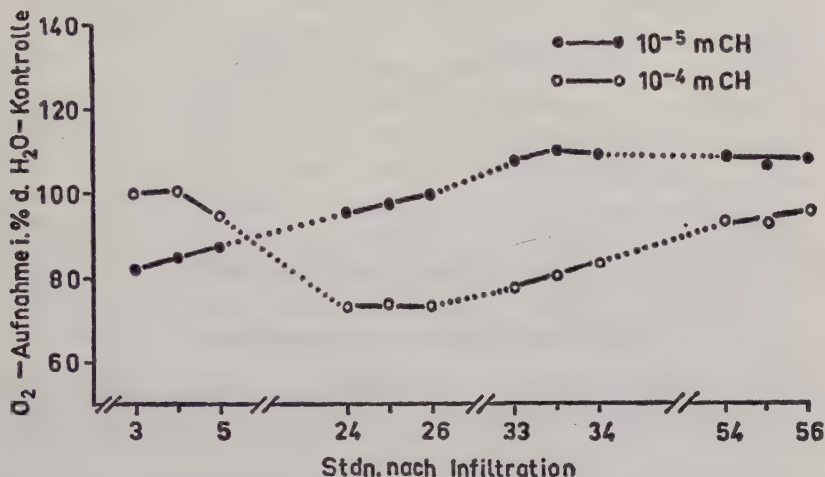


Abb. 10: Sauerstoffaufnahme der an der Pflanze reagierenden Blätter von *Phaseolus multiflorus* während verschiedener Zeiten nach CH-Infiltration im 14stündigen Langtag. Werte in % der Wasserkontrolle.

c) Atmung unter verschiedenen photoperiodischen Bedingungen bei *Hyoscyamus niger*

Die Tatsache, daß CH bestimmter Konzentration bei *Hyoscyamus niger* Blütenbildung auslöst und gleichzeitig die Atmung stimuliert, veranlaßte uns, auch die Sauerstoffaufnahme bei photoinduktiven Bedingungen zu messen.

Die Methodik war die gleiche wie bei den bisherigen Versuchen zur Sauerstoffaufnahme bei Reaktion an der Pflanze: Die Blätter wurden an der Pflanze den verschiedenen photoperiodischen Bedingungen ausgesetzt und dann zu verschiedenen Zeiten die Atmung an ausgestanzten Blattstückchen bestimmt. Die Werte sind in Abb. 11 in % der KT-Kontrolle aufgezeichnet.

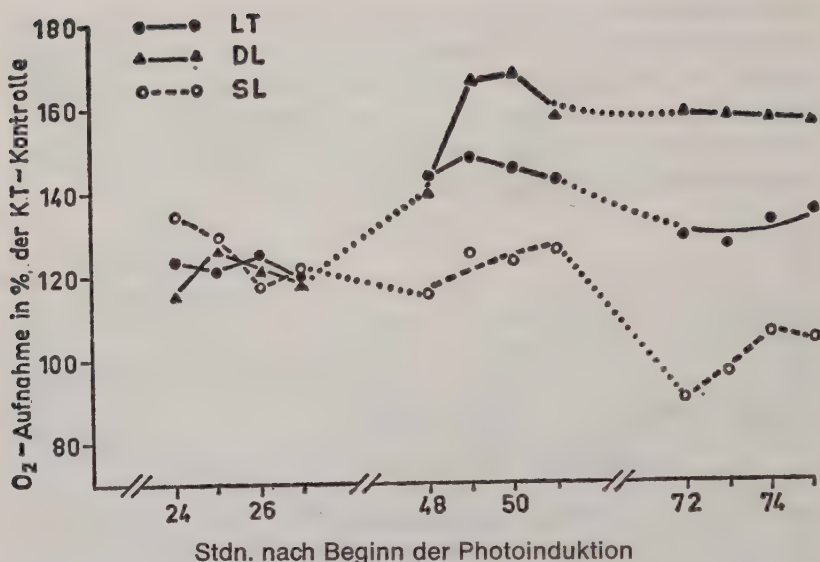


Abb. 11: Sauerstoffaufnahme von an der Pflanze reagierenden Blättern nach verschieden langer Photoinduktion. Werte in % der unbehandelten Kontrollen.

Nach 24 Stunden, die die Pflanzen ihren jeweiligen photoperiodischen Bedingungen ausgesetzt waren, ist die Sauerstoffaufnahme aller behandelten Blätter leicht erhöht. Nach 48 Stunden ist jedoch die Atmungsrate je nach Lichtbedingung verschieden: Bei DL wird mit über 60 % die höchste Steigerung erreicht, bei LT ist die Atmung um etwa 45 % erhöht, bei SL war dagegen keine weitere Steigerung zu verzeichnen. Bei allen drei Bedingungen fallen am dritten Tag die Werte ab, bei SL sogar unter die der KT-Kontrolle.

Einwände, daß Pflanzen mit längeren Belichtungszeiten auch vermehrt Photosyntheseprodukte für die Dissimilation zur Verfügung haben und somit verstärkt veratmen könnten, müssen vor allem die Werte 24 Stunden nach Versuchsbeginn berücksichtigen. Denn auch hier hatten die Pflanzen schon 24 Stunden lang „ihre“ jeweiligen Bedingungen. Da aber zu dieser Zeit die Atmung nur gering erhöht war, an den folgenden Tagen jedoch bei den blüteninduzierenden Bedingungen stark anstieg, so sind Korrelationen zwischen Blühinduktion und Atmungssteigerung naheliegend.

4. Die Wirkung weiterer Antimetabolite auf die Blütenbildung von *Hyoscyamus niger*

a) Die Wirkung von **Chloramphenicol**

Chloramphenicol (CAP) ist ein Antibiotikum von *Streptomyces venezuelae*, wird heute aber auch synthetisch hergestellt.

Seine Wirkung auf die Proteinsynthese ist insofern spezifisch, als es nur an 70 S Ribosomen angreift, speziell an der 50 S Untereinheit (BÜCHER u. SIES 1969), während die 80 S Ribosomen unbeeinflusst bleiben (MARGULIES a. BRUBAKER 1970, untersucht an *Phaseolus vulgaris*); die letzteren Autoren konnten daneben eine Hemmung der Chlorophyllbildung beobachten und somit indirekt auch eine Abnahme der Photosyntheseaktivität. Nach verschiedenen Angaben (Lit. siehe YOUNG a. NAKADA 1970) hemmt CAP bei *Escherichia coli* die Peptidbildung und verändert anscheinend auch die 70 S Ribosomen. Bei Mais-mitochondrien stellten HANSON a. HODGES (1963) eine Hemmung der oxydativen Phosphorylierung fest und NEUPERT, SCHWAB et al. (1969) berichten, daß die mitochondriale Proteinsynthese spezifisch durch dieses Antibiotikum vermindert wird (untersucht an *Neurospora*).

In bezug auf die Atmung soll CAP verschiedenen Autoren zufolge die Sauerstoffaufnahme nicht hemmen (KATAGIRI et al. 1959); im Gegenteil: Schon PADRON et al. (1954) stellten eine hohe endogene Atmung bei *Micrococcus pyrogenes* fest. BILLER u. RAU (1962, unveröffentlicht) konnten bei *Hyoscyamus niger* nach Infiltration der Blätter mit sehr hohen Konzentrationen in den ersten Stunden eine rapid erhöhte Atmung messen: Mit $2 \cdot 10^{-3}$ m CAP erhielten sie nach sechs Stunden ca. 380%ige Atmungssteigerung, danach erfolgte jedoch ein rascher Abfall dieser Aktivität, wobei die Blätter innerhalb von 24 Stunden abstarben.

aa) Blütenbildung durch Infiltration von Chloramphenicol in die Blätter von *Hyoscyamus niger*

In Vorversuchen mußten zunächst die Konzentrationen ermittelt werden, die die Blätter längere Zeit ohne äußere Schäden vertragen. Dabei stellte sich heraus, daß niedrige Konzentrationen — bis zu $5 \cdot 10^{-5}$ m Chloramphenicol — in der ersten Woche keine äußerlich erkennbaren Schädigungen an den Blättern verursachten; dagegen wurden die mit

10^{-4} m CAP infiltrierten Blätter bereits nach wenigen Tagen schlaff und bei 10^{-3} m CAP waren sie nach einigen Tagen schon abgestorben. Die Ergebnisse über die Wirkung von CAP auf die Blütenbildung sind in Tab. 11 zusammengestellt.

Tab. 11: Blühinduktion bei einmaliger Infiltration von Chloramphenicol in Blätter von *Hyoscyamus niger* unter KT-Bedingungen.

Konz. Chloramph.	Vers.- pflanzen	Aus- wertbar	Blühend			Vegetativ		
			Zahl	%	Blatt- zuwachs	Zahl	%	Blatt- zuwachs
H ₂ O	16	15	0	0	—	15	100	25
10^{-6}	8	6	0	0	—	6	100	25
10^{-5}	30	28	1	4	6	26	96	24
$5 \cdot 10^{-5}$	16	16	0	0	—	16	100	20
10^{-4}	44	35	0	0	—	35	100	20
$2 \cdot 10^{-4}$	28	25	2	8	8	23	92	19
$5 \cdot 10^{-4}$	20	1	0	0	—	1	100	13

Von 162 Pflanzen, die mit den in Frage kommenden Konzentrationen infiltriert worden waren, blühten nur drei Exemplare; diese Tatsache könnte zusammen mit den bei der Präparation festgestellten z. T. etwas erhöhten Vegetationskegeln als minimale, unterschwellige Induktion interpretiert werden, wobei dann die Blütenanlagen wohl nur bei solchen Pflanzen induziert wurden, die eine günstige Konstellation aller bei der Blütenbildung einwirkenden Faktoren aufwiesen. Diese Annahme ließe sich festigen, wenn bei teilweiser Photoinduktion (z. B.

Tab. 12: Auslösung der Blütenbildung durch Addition von 3 LT und Chloramphenicol in Blätter von *H. n.*

Bedingungen: 3 LT + Konz. Chloramph.	Vers.- pflanzen	Aus- wertbar	Blühend		Vegetativ	
			Zahl	%	Zahl	%
H ₂ O	8	8	3	38	5	62
10^{-5}	8	8	2	25	6	75
$5 \cdot 10^{-5}$	16	16	7	44	9	56
10^{-4}	16	14	6	43	8	57
$5 \cdot 10^{-4}$	16	1	0	0	1	100

durch 3 LT) eine zusätzliche Steigerung der Blüßrate durch CAP-Infiltration zu verzeichnen wäre; die Auswertung eines solchen Versuchsansatzes ist in Tab. 12 erfaßt.

Die Ergebnisse zeigen, daß Chloramphenicol die durch Photoinduktion ausgelöste Blüßrate von 38 % zwar keineswegs hemmt; der Förderungseffekt ist allerdings wiederum zu gering, als daß daraus Rückschlüsse auf eine eventuelle Stimulierung der Photoinduktion durch CAP gezogen werden könnten.

bb) Sauerstoffaufnahme bei Infiltration von Chloramphenicol in die Blätter von *Hyoscyamus niger*

Bei diesen Versuchen haben wir CAP ebenfalls in Blätter an der Pflanze infiltriert und zu verschiedenen Zeiten Blattstücke zur Messung der Atmungsintensität ausgestantzt; dabei wurden die beiden Konzentrationen des unteren und oberen Grenzbereichs der Verträglichkeit ausgewählt.

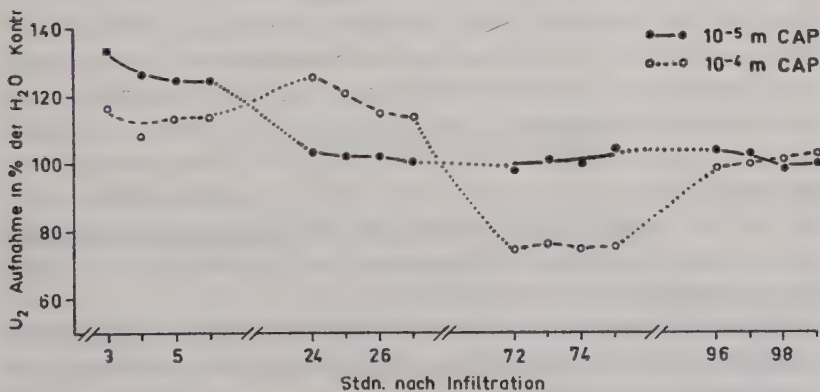


Abb. 12: Sauerstoffaufnahme von an der Pflanze reagierenden Blättern während verschiedener Zeiten nach Infiltration mit Chloramphenicol. Werte in % der Wasserkontrollen.

Wie aus Abb. 12 hervorgeht, bewirkt 10⁻⁵ m CAP nur sofort nach der Infiltration eine etwa 25%ige Atmungssteigerung des Blattgewebes; an den folgenden Tagen ist die Sauerstoffaufnahme gleich wie die der

Wasserkontrolle. Bei 10^{-4} m CAP steigen die sofort gemessenen Werte von gut 10 % Erhöhung auf rund 20 % am 1. Tag nach Infiltration, fallen dann aber am 2. Tag bis zu 25 % unter die Kontrolle ab, um sich dann am 3. Tag der Höhe der Kontrollwerte anzugleichen. Insgesamt sind also die Atmungsschwankungen nur gering und unterscheiden sich erheblich von den unter induktiven Bedingungen erhaltenen Werten.

b) Die Wirkung von Puromycin

Puromycin ist ein von *Streptomyces alboniger* produziertes Antibiotikum; es wird vor allem gegen Trypanosomen und verschiedene Bakterien eingesetzt.

Strukturmäßig gleicht das Puromycin der t-RNS für Phenylalanin und Tyrosin, wobei an der Aminogruppe die Peptidbindung zum Protein geknüpft wird; da ihm aber das Anticodon fehlt, kann keine Anlagerung an der m-RNS stattfinden. Der Hemmeffekt beruht also auf einer Unterbrechung der Synthesekette. Auch nach HARTMANN et al. (1968) wirkt Puromycin an der A-Haftstelle des Ribosoms offenbar als inaktives Analogon (Antimetabolit) einer aktivierten Aminosäure (Aminoacyl-t-RNS), wodurch dann nur kurze Peptidstücke entstehen können. Dabei beeinflusst es nach VAZQUEZ (1969) sowohl die 70 S Ribosomen (speziell die 50 S Untereinheiten) als auch die 80 S Ribosomen (speziell die 60 S Untereinheiten). Auch DE GROOT (1970) konnte nachweisen (an *Escherichia coli*), daß Puromycin an der Peptidyl-t-RNS angreift. BLOBEL u. SABATIM (1971) erhielten mit Puromycin eine Dissoziation von Säugetierribosomen in biologisch aktive Untereinheiten, also keine direkte Hemmung der Proteinsynthese.

Bei Atmungsmessungen an Runkelrübenscheiben fanden MAC DONALD a. ELLIS (1966) keine Stimulierung durch Puromycin, aber eine Hemmung der Proteinsynthese.

Bei diesem Antimetaboliten haben wir uns auf Blühversuche beschränkt. Die mit Puromycin hoher Konzentrationen (ab 10^{-4} m) infiltrierten Blätter wiesen dabei nach wenigen Tagen starke Schädigungen auf, die nach einer Woche in inselförmige Vertrocknungen übergingen, und nach ca. 14 Tagen erfolgte völliger Blattabfall. Bei niedrigeren Konzentrationen konnten keine äußeren Schäden registriert werden.

Tab. 13: Blühinduktion durch einmalige Infiltration von Puromycin in Blätter von *H. n.* unter KT-Bedingungen.

Konz. an Puromycin	Vers.-pflanzen	Auswertbar	Blühend			Vegetativ		
			Zahl	%	Blattzuwachs	Zahl	%	Blattzuwachs
H ₂ O	8	8	0	0	—	8	100	25
5 · 10 ⁻⁶	14	13	0	0	—	13	100	24
10 ⁻⁵	25	23	0	0	—	23	100	23
5 · 10 ⁻⁵	25	21	0	0	—	21	100	24
10 ⁻⁴	26	22	1	5	8	21	95	25
2 · 10 ⁻⁴	12	10	0	0	—	10	100	25

Wie aus Tabelle 13 zu entnehmen ist, zeigten mit Ausnahme von einer Pflanze alle anderen 88 auswertbaren Pflanzen keine Blühreaktion. Da auch der Blattzuwachs keine typischen Unterschiede zur Wasserkontrolle ergab und die Vegetationspunkte nur äußerst selten erhöht waren, kann geschlossen werden, daß Puromycin auf die Blütenbildung keine induzierende Wirkung hat.

II. PROTEINSYNTHESE IM BLATT

1. Bilanz des Proteingehalts und des ¹⁴C-Leucin-Einbaus

Zur Beurteilung der im folgenden dargestellten Versuche war es zunächst notwendig, die Größe des Proteingehalts, den Anteil der einzelnen Fraktionen sowie die Verteilung von zugeführtem ¹⁴C-Leucin im Blatt zu untersuchen.

a) Verhältnis von Strukturproteinen zu löslichen Proteinen

Die Berechnung des Gesamtproteins der Blattspreite erfolgte über die Bestimmung des Stickstoffgehaltes nach KJELDAHL; mit dieser Methode wurde der Stickstoffgehalt der gesamten Blattspreite und des Zentrifugats (im wesentlichen also der unlöslichen Stickstoffverbindungen, insbesondere der Strukturproteine) erfaßt. Die löslichen Proteine konn-

ten durch TCA-Fällung aus dem Überstand der Zentrifugation (2×30 Min. bei $50\,000 \times g$) ermittelt werden.

Die Blattspreite hatte im Mittel folgende Größen:

Blattfläche	$55 \pm 10^*) \text{ cm}^2$
Gesamtprotein pro Blatt	$90 \pm 20^*) \text{ mg}$
Lösliches Protein	$45 \pm 10^*) \text{ mg}$
Unlösliches Protein	$45 \pm 10^*) \text{ mg}$

Demnach ist etwa die Hälfte des Gesamtproteins als lösliches Protein im Überstand enthalten, während der Rest in den unlöslichen Bestandteilen des Blattes (Zentrifugat!) lokalisiert ist. Da die Strukturproteine bei Stoffwechselvorgängen meist nicht aktiv steuernd eingreifen, waren für unser Problem hauptsächlich die löslichen Proteinfractionen ausschlaggebend.

b) Jahresgang des löslichen Proteingehalts

Da sich der Proteingehalt in Pflanzengewebe im Laufe eines Jahres möglicherweise ändert, sollte untersucht werden, inwiefern man bei *Hyoscyamus niger* mit konstantem Proteingehalt während des ganzen Jahres rechnen kann (Abb. 13).

Ein Maximum des Gehalts an löslichen Proteinen pro cm^2 zu Beginn der natürlichen Hauptvegetationsperiode (April–Mai) und ein Minimum in den Wintermonaten – vor allem im Dezember – kennzeichnen die

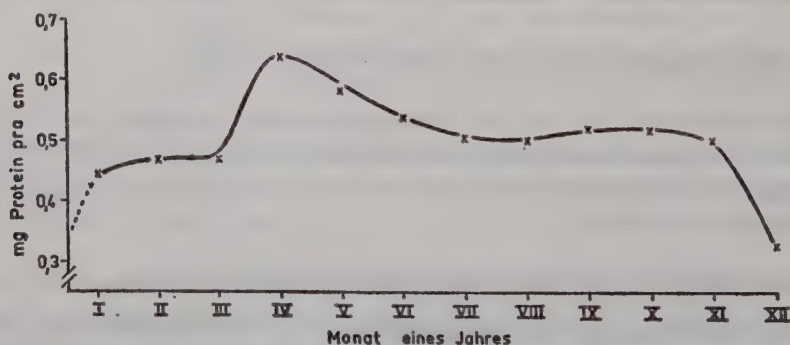


Abb. 13: Jahresgang des Gehalts an löslichen Proteinen der Blätter von *H. n.* pro cm^2 Blattfläche.

*) Alter der Blätter und Versuchsbedingungen bestimmten die relative mittlere Varianz.

Jahreskurve. In den übrigen neun Monaten des Jahres liegt der Proteingehalt jedoch erstaunlich konstant um 0,5 mg/cm². Das spricht für eine gleichmäßige Anzucht trotz der wechselnden Belichtungsbedingungen und für die gleichmäßige Auswahl der Versuchsblätter. Bemerkenswert ist, daß das Minimum im Proteingehalt mit der von uns festgestellten „Blüruhe“ jahreszeitlich zusammenfällt!

c) Bilanz der Radioaktivitätsverteilung bei ¹⁴C-Leucin-Zufuhr

Alle Einbauraten gewinnen erst an Bedeutung, wenn man sie in ihrer Relation zur eingesetzten, d. h. gefütterten ¹⁴C-Leucin-Radioaktivität und zu den Anteilen der Markierung der übrigen Blattbestandteile sieht.

Wir haben daher bei einigen Versuchen eine Gesamtbilanz aufgestellt; neben der Messung des Einbaus wurde auch die Rückstandsanalyse der eingesetzten Radioaktivität gemacht. Die einzelnen Komponenten konnten wie folgt erfaßt werden: Das lösliche Protein wurde durch TCA-Fällung aus dem Zentrifugierüberstand des homogenisierten Blattes (2 × 30 Min. bei 50 000 x g) gewonnen; das Zentrifugat stellt die in der Puffermischung unlöslichen und daher bei mittleren g-Zahlen abzentrifugierbaren Bestandteile des Blattes dar; die Mittelrippe des Blattes und der Blattstiel wurden gemeinsam bestimmt; die im Becherglas bei der Fütterung haftengebliebene ¹⁴C-Menge wurde ebenfalls gemessen. Das in den unlöslichen Bestandteilen des Blattes (= Stiel, Mittelrippe und Zentrifugat) enthaltene ¹⁴C-Leucin wurde mit der Verbrennungsmethode nach KALBERER u. RUTSCHMANN (1961) bestimmt. Aufgeschlüsselt nach den genannten Komponenten, ergaben sich folgende Mittelwerte der Radioaktivitätsverteilung (Mittelwerte aus fünf Versuchen, bezogen auf 1 µC L-Leucin-1-¹⁴C ~ 2,22 Mill. dpm):

Zentrifugierüberstand	509 600 dpm/Blatt	ca. 24 ± 10 ‰*)
Hierin enthalten:		
lösliches Protein	418 300 dpm/Blatt	ca. 20 ± 10 ‰*)
Zentrifugat (50 000 g)	429 800 dpm/Blatt	ca. 21 ± 5 ‰*)
Mittelrippe und Stiel	1 065 500 dpm/Blatt	ca. 51 ± 15 ‰*)
Becherrückstand	84 200 dpm/Blatt	ca. 4 ± 2 ‰
Gesamt:	2 089 100 dpm/Blatt	

*) Nur bei unbehandelten Kontrollen lag die höchste Abweichung des Einbaus erheblich unter oder über dem Mittelwert, wie aus Einzelergebnissen (Tab. 14) ersichtlich ist.

Damit wurden durch Rückstandsanalyse ca. 94 % des eingesetzten $1 \mu\text{C } ^{14}\text{C}$ -Leucins erfaßt.

Wir haben in der Tabelle 14 repräsentativ einerseits unbehandelte Kontrollen und andererseits mit 2-TU infiltrierte Proben (mit je 6 Std. und 24 Std. Einbauzeit von $1 \mu\text{C } ^{14}\text{C}$ -Leucin) einander gegenübergestellt.

Tab. 14: Bilanz der Radioaktivitätsverteilung bei ^{14}C -Leucin-Zufuhr unter verschiedenen Bedingungen.

Angaben in % der Gesamtaktivität pro Blatt. Hinter den Bedingungen K (= Kontrolle) bzw. 2-TU sind die Einbauzeiten für $1 \mu\text{C } ^{14}\text{C}$ -Leucin angegeben.

Komponenten	Verteilung des ^{14}C -Leucins in % bei versch. Bedingungen			
	K/6 Std.	K/24 Std.	10^{-3} m 2-TU/ 6 Std.	10^{-3} m 2-TU/ 24 Std.
Zentrifugier- überstand	17	15	26	33
darin enthalten: lösliches Protein	(5)	(7)	(23)	(29)
Zentrifugat	4	5	19	23
Stiel und Mittelrippe	76	73	49	40
Becherglas	3	6	2	3

Aus den Werten der ersten Rubrik der Tabelle läßt sich ersehen, wieviel % der Radioaktivität ins lösliche Protein eingebaut wurden und – als Differenz zum Zentrifugierüberstand – wieviel als wahrscheinlich zum größten Teil freies ^{14}C -Leucin vorliegt. Dabei zeigt sich, daß bei unbehandelten Kontrollen nur rund $\frac{1}{3}$ – $\frac{1}{2}$ des ^{14}C -Leucins, bei den mit 2-TU reagierenden Blättern jedoch fast die gesamte Radioaktivität des Überstandes im Protein fixiert ist. Das bedeutet, daß für den weiteren Einbau bei den Kontrollen noch genügend freies, bei 2-TU-Proben jedoch fast kein freies ^{14}C -Leucin als Vorrat aus der Spreite selbst zur Verfügung steht. Bei den mit dem Antimetaboliten 2-TU infiltrierten

Blättern verschoben sich die übrigen Werte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle außerdem folgendermaßen: Die Aktivität in Stiel und Mittelrippe verringerte sich stark, während sich sowohl im Zentrifugat (Blattrückstand) als auch im Zentrifugierüberstand und – was für unser Problem noch wesentlicher ist – im löslichen Protein der Einbau z. T. erheblich erhöhte. Dieser Einbau in das lösliche Protein ist bei der angewandten Methode – Fütterung der Aminosäure über den Stiel – verhältnismäßig gut; üblicherweise kann man bei einem Einbau von über 10 % der eingesetzten Radioaktivität ins Protein bei höheren Pflanzen von einer deutlichen Markierung sprechen. Damit war bei unseren Versuchen gesichert, daß durch Messung des löslichen Proteins charakteristische Änderungen des aktiven Proteinstoffwechsels erfaßt werden können.

d) Prüfung der Verteilung der Radioaktivität durch Autoradiographie

Die Verteilung der Radioaktivität innerhalb der Blattspreite zusätzlich zur quantitativen Gesamtbilanz sollte zeigen, ob bestimmte Bezirke des Blattes (z. B. jene um die Mittelrippe) verstärkt mit ^{14}C -Leucin-Lösung versorgt werden. Außerdem sollte die Verteilung unter verschiedenen Versuchsbedingungen geprüft werden.

Dazu wurden Blätter nach der Infiltration (Wasser bzw. CH) sofort mit ^{14}C -Leucin gefüttert, nach verschiedener Einbauzeit rasch ausgetrocknet und längere Zeit auf Röntgenpapier exponiert.

Repräsentativ für mehrere Autoradiographien haben wir drei Abbildungen (Abb. 14) ausgewählt.

Die Verteilung der Radioaktivität variiert je nach Versuchsbedingung. Während bei nicht infiltrierten Proben (keine Abb.) und der Wasserkontrolle die Radioaktivität überwiegend in den Leitsystemen der Blätter lokalisiert ist und von dort auf das Spreitengewebe ausstrahlt, verteilt sich bei den mit $3 \cdot 10^{-5}$ m CH infiltrierten Blättern der Hauptteil der Markierung auf die Spreitenbezirke zwischen den Hauptleitsträngen. Die übrigen Bereiche der Spreite sind jedoch in allen Fällen sichtlich ebenfalls mit ^{14}C -Leucin versorgt worden. Man kann diesen Abbildungen außerdem entnehmen, daß durch die CH-Infiltration das ^{14}C -Leucin verstärkt in das Blattgewebe gelangen konnte; dieser Befund bestätigt auch die Ergebnisse der Bilanz-Untersuchungen.

2. Die Wirkung von Cycloheximid auf die Synthese löslicher Proteine

Eine große Anzahl von Autoren berichtet über eine fast totale Blockierung der Proteinsynthese durch CH. So hemmt nach MORRIS (1967) 2,5 $\mu\text{g/ml}$ CH den Einbau von u. a. ^{14}C -Phenylalanin und $^{14}\text{CO}_2$ ins Protein von Chlorella bis zu 80 %; auch POLYA (1968) an Wurzeln von roten Beeten, KANG u. RAY (1969) an Bohnenhaken sowie TASCA a. HILLMAN (1970) an Mäuseembryonen bestätigen CH als Inhibitor der Proteinsynthese.

Andere Arbeitsgruppen veröffentlichten jedoch Ergebnisse mit differenzierteren Aussagen über die CH-Wirkung. So erhielten SCHWOCHAN a. HADWIGER (1969) bei hoher CH-Konzentration (300 $\mu\text{g/ml}$) an Erbsen eine starke Hemmung, bei niedrigen Konzentrationen (unter 10 $\mu\text{g/ml}$) jedoch eine Steigerung der Proteinsynthese. Auch ELLIS u. MAC DONALD (1970) können bei höheren Pflanzen keine deutliche Hemmung des Leucineinbaus und der Glukoseaufnahme durch 1–100 $\mu\text{g/ml}$ CH finden, sondern nur eine zeitliche Verschiebung von wenigen Stunden. Wegen dieser z. T. widersprüchlichen Aussagen war es also nötig, die Proteinsynthese unter blühinduktiven CH-Konzentrationen bei *Hyoscyamus niger* festzustellen.

Durch Revertierungsversuche (Thiouracil — Uracil) zur Blütenbildung haben EICHHOFF u. RAU (1969) an *H. n.* den Zeitraum der im Blatt ablaufenden Induktionsvorgänge auf die ersten Tage nach Induktionsbeginn lokalisieren können. Ergänzt werden diese Ergebnisse durch Hemmversuche mit Actinomycin D und Fluoruracil an der KTP *Chenopodium* (KREKULE 1971). Demnach sind die ersten Tage auch für eventuelle Änderungen der Proteinsynthese in den Blättern von *H. n.* maßgebend.

a) CH in isolierte Blätter

aa) Proteinmenge

Hierzu wurden die löslichen, mit TCA fällbaren Proteine während der ersten 96 Std. nach Infiltration von CH in die Blätter von *H. n.* ermittelt und daraus der Proteingehalt pro Blattfläche (mg Prot/cm^2) berechnet.

In den Kurven der Abb. 15 sind die Werte der ersten 6 Std. und die zwischen 48 und 96 Std. speziell zu beachten. Beim 6-Stunden-Wert

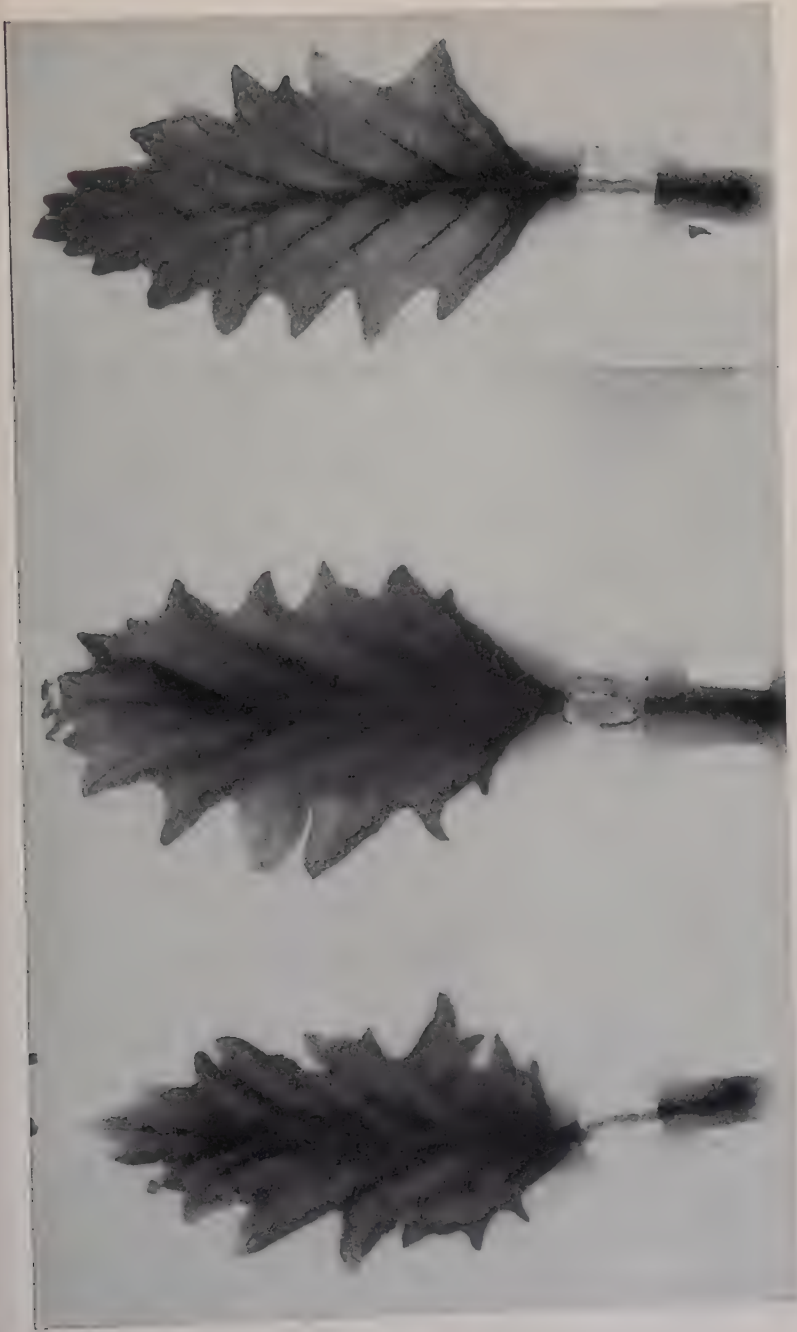


Abb. 14: Prüfung der Verteilung der Radioaktivität durch Autoradiographie – nach einmaliger Fütterung mit 1 μ C L-Leucin-1- 14 C pro Blatt – unter verschiedenen Versuchsbedingungen:

- a) Infiltration von $3 \cdot 10^{-3}$ M CH ins Blatt – 24stündige Einbauzeit des 14 C-Leucins,
- b) wie a), nur 72 stündige Einbauzeit des 14 C-Leucins,
- c) Infiltration von Wasser ins Blatt – 72stündige Einbauzeit des 14 C-Leucins.

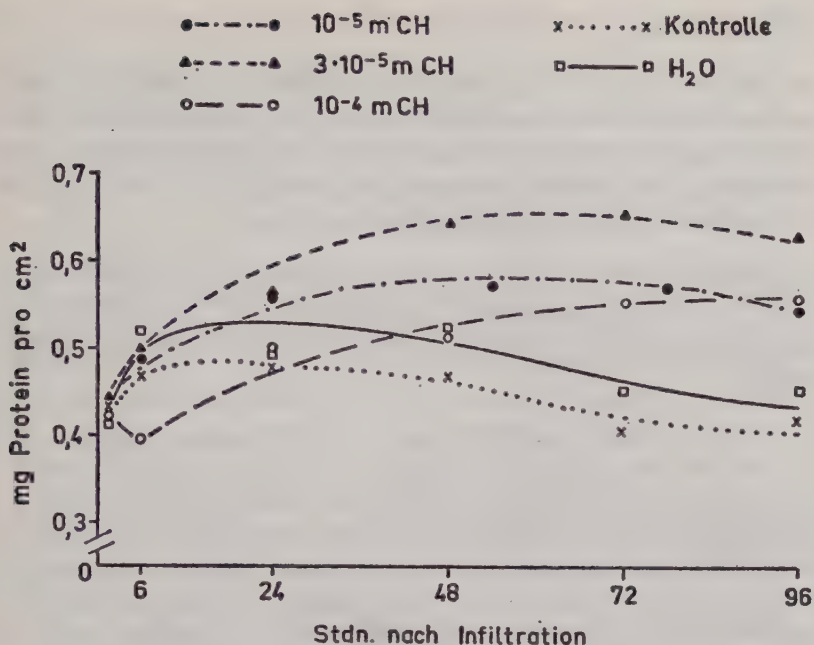


Abb. 15: Gehalt an löslichen Proteinen pro Blattfläche in isolierten, mit CH infiltrierten Blättern von *Hyoscyamus niger*.

liegen die Daten der CH-Konzentrationen etwa auf der Höhe der der Wasserkontrolle, wobei sie nur bei der Konzentration 10^{-4} m CH stark abfallen. Um den 48-Stunden-Wert herum erreichen alle Bedingungen (bis auf 10^{-4} m CH) ihr Maximum des Proteingehalts; danach bleibt er bei CH-behandelten Proben fast konstant, während er bei den Kontrollen absinkt. Die höchsten Werte werden bei $3 \cdot 10^{-5}$ m CH erreicht; sie liegen 72 Std. nach Infiltration um fast 50 % über denen der Wasserkontrolle.

Diese Daten sprechen dafür, daß unter dem Einfluß von CH die lösliche Proteinmenge pro cm^2 in den Blättern erhöht wird. Allerdings läßt sich daraus direkt noch keine erhöhte Proteinsynthese ableiten, weil ja auch ein verminderter Abbau des gesamten Proteins oder ein verstärkter Abbau der Strukturproteine zu einer Zunahme des löslichen Proteins führen könnte. — Anhaltspunkte für die erste Annahme liefert die Arbeit von MARTIN a. THIMANN (1970), worin CH u. a. als Hemmstoff der Synthese abbauender Proteine (Proteasen, Hydrolasen) beschrieben wird.

bb) ^{14}C -Gabe sofort nach Infiltration

Da nach JOY a. FOLKES (1965) sowie LARSON a. BEEVERS (1965) das an Pflanzengewebe applizierte $\text{L-}^{14}\text{C}$ -Leucin verhältnismäßig spezifisch für die Proteinsynthese verwendet wird, kann demnach eine Aktivierung des Proteinstoffwechsels an gesteigerten Einbauraten von ^{14}C -Leucin in die Proteine nachgewiesen werden.

Die abgeschnittenen Blätter wurden mit CH infiltriert, danach sofort mittels ^{14}C -Leucin pulsmarkiert, anschließend zur Nachreaktion in Nährlösung gestellt und zu verschiedenen Zeiten Messungen durchgeführt.

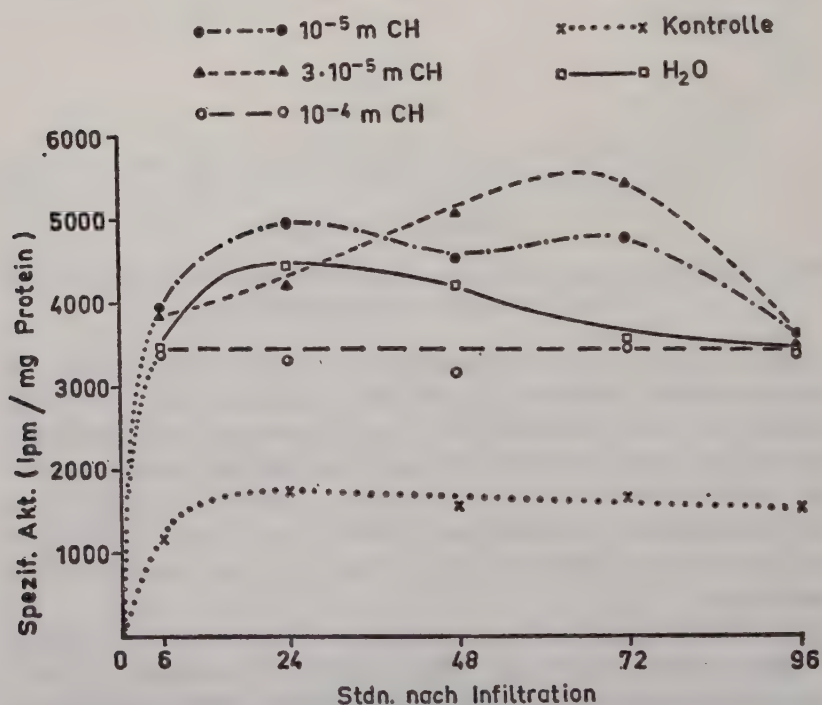


Abb. 16: ^{14}C -Einbau ins Protein isolierter Blätter von H. n. nach Infiltration verschiedener CH-Konzentrationen bei sofortiger ^{14}C -Leucin-Gabe.

Der ^{14}C -Einbau ins Protein der infiltrierten Blätter (Abb. 16) ist überraschend hoch; in % angegeben beträgt der Unterschied zwischen

unbehandelter Kontrolle und Wasserkontrolle ungefähr 300 % (24-Std.-Wert) bis 225 % (72-Std.-Wert). Da alle infiltrierten Blätter untereinander nicht solche großen Unterschiede aufweisen — trotz qualitativ und quantitativ unterschiedlicher Infiltrationslösungen —, stimuliert demnach schon die Infiltration allein die ^{14}C -Leucin-Aufnahme beträchtlich. Dazu sei auf die ^{14}C -Gesamtbilanz hingewiesen (Tab. 14), bei der sich gezeigt hat, daß infiltrierte Blätter mehr Radioaktivität in der Spreite, aber weniger im Stengel aufwiesen als die unbehandelten Kontrollen.

Bei der unbehandelten Kontrolle erfolgt nach dem relativ schwachen ^{14}C -Einbau während der ersten 24 Std. keine weitere Zunahme der spezifischen Aktivität, während der Kurvenverlauf der infiltrierten Proben Schwankungen unterworfen ist: Bei den wasserinfiltrierten Blättern ist nach starkem Anstieg in den ersten 24 Std. nach Infiltration ein leichter, aber stetiger Abfall des ^{14}C -Gehalts zu verzeichnen. Für $3 \cdot 10^{-5}$ m CH ergibt sich nach ebenfalls starkem Anstieg in den ersten 6 Std. eine ständig leicht zunehmende Markierung der Proteine bis zu einem breiten Gipfel zwischen 48 und 72 Std., der weit über den der Wasserkontrolle ragt; nach 72 Std. jedoch erfolgt ein rapider Abfall, so daß der 96-Std.-Wert etwa gleich hoch ist wie der der Wasserkontrolle. Auch mit 10^{-5} m CH werden insgesamt erhöhte Radioaktivitätswerte erreicht, obwohl das Kurvenbild weniger markant ist wie bei $3 \cdot 10^{-5}$ m CH. Der ^{14}C -Einbau unter 10^{-4} m CH ist dagegen gehemmt; er liegt zwischen 6 und 72 Std. deutlich unter dem der Wasserkontrolle (aber noch weit über dem der unbehandelten Kontrolle!) — nachdem in den ersten 6 Std. ein bestimmtes Niveau erreicht wurde.

Zur Verdeutlichung und, um einen Vergleich mit ähnlichen Versuchen zu ermöglichen, haben wir die Ergebnisse in % der Wasserkontrolle umgerechnet (Abb. 17).

Daraus ist zu ersehen, daß 10^{-5} m CH den ^{14}C -Einbau optimal nach 72 Std., und zwar um fast 40 % über die Wasserkontrolle steigert, $3 \cdot 10^{-5}$ m CH sogar in gleicher Zeit eine Steigerungsquote um 50 % ergibt; bei 10^{-4} m resultiert dagegen eine bis zu 25%ige Hemmung (24-Std.- und 48-Std.-Wert) gegenüber der Wasserkontrolle.

Diese durch Pulsmarkierung mit anschließend langer Einbauzeit erhaltenen Ergebnisse sprechen für eine erhöhte Synthese oder eventuell einen verminderten Abbau von Proteinen durch bestimmte Konzen-

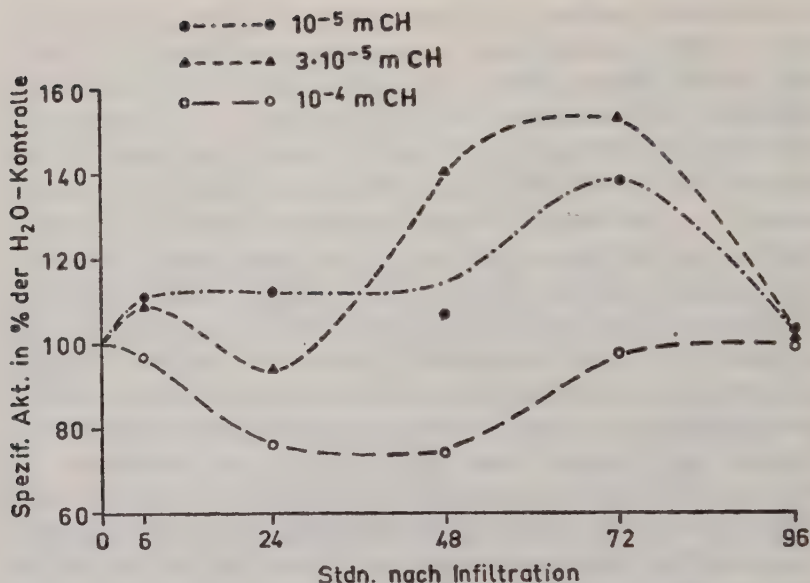


Abb. 17: Wie Abb. 16, nur in % der Wasserkontrollen.

trationen von CH (um $3 \cdot 10^{-5}$ m und 10^{-5} m CH); ein Hemmeffekt tritt nur bei hohen Molaritäten auf (ab 10^{-4} m CH), bei denen dann aber auch die Blätter nach wenigen Tagen absterben. Die Feststellung einiger Autoren, daß CH die Proteinsynthese hemmt, trifft demnach bei Blättern von *H. n.* in dieser allgemeinen Form nicht zu, weil ja bei bestimmten Konzentrationen (um $3 \cdot 10^{-5}$ m CH) bis zu 72 Std. sowohl der Proteingehalt pro Blattflächeneinheit als auch die spezifische Aktivität steigen. Allerdings können wir aus den Ergebnissen definitive Schlüsse nur bis 24 Std. nach Gabe des Leucinpulses ziehen, weil nur bis zu diesem Zeitpunkt bei den Kontrollen ein Einbauüberschuß des zugeführten, markierten Leucins zu verzeichnen ist. Die danach einsetzende Stagnation bzw. Abnahme der spez. Aktivität bei den Kontrollen läßt sich vielleicht aus einem Mangel an verfügbarem ^{14}C -Leucin erklären; zu diskutieren wäre vor allem eine mögliche Erschöpfung des ^{14}C -Pools durch ablaufende Synthesen, Einbau in Strukturproteine und Fettsäuren oder aber ein durch Alterungsprozesse gehemmter Einbau der Aminosäure (vergleiche CHAILAKHYAN 1968, der an isolierten Blättern von LTP schnellen Turgorverlust sowie rasches Altern feststellen

konnte). Unter bestimmten CH-Konzentrationen würden diese Prozesse dann eventuell verzögert.

cc) Ständige Gabe von ^{14}C -Leucin nach CH-Infiltration

Die eben angeschnittene Frage, ob isolierte Blätter nach einiger Zeit die Aufnahme bzw. den Einbau der von außen zugeführten Stoffe (hier Aminosäuren) einstellen, sollte in der folgenden Versuchsreihe untersucht werden.

Wir fütterten dabei an infiltrierte Blätter während der gesamten Versuchsdauer eine Nährlösung mit konstanter Konzentration an ^{14}C -Leucin ($1\text{ }\mu\text{C}/10\text{ ml}$ Nährlösung) und konnten damit den zeitlichen Verlauf des Einbaus von ^{14}C -Leucin ins Protein in Abhängigkeit von der CH-Wirkung im Blatt verfolgen (Abb. 18).

Bei allen Bedingungen findet auch über 24 Std. hinaus ein weiterer, wenn auch z. T. nur geringer Einbau von ^{14}C -Leucin ins Protein statt.

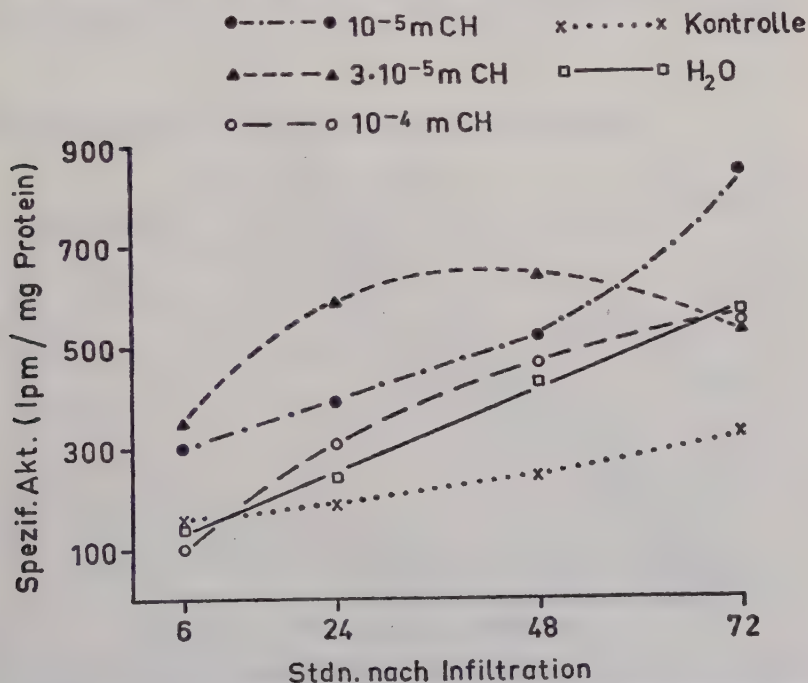


Abb. 18: ^{14}C -Einbau in die löslichen Proteine bei ständiger Fütterung des isolierten Blattes mit ^{14}C -Leucin ($1\text{ }\mu\text{C}/10\text{ ml}$ Nährlösung).

Dieser Anstieg verläuft für fast alle Versuchsansätze ab 6 Std. nach Infiltration annähernd linear, nur bei den durch $3 \cdot 10^{-5}$ m CH erhaltenen Werten stagniert der Netto-Einbau ab 24 Std. Allgemein ist trotzdem bei mit CH infiltrierten Blättern eine leichte Erhöhung der spezifischen Aktivität gegenüber den Kontrollen festzustellen. Wenngleich diese Förderung nur gering ist, so kann damit jedenfalls angenommen werden, daß CH den Einbau von ^{14}C -Leucin ins Protein nicht hemmt. Auch bei Berechnung der spezifischen Aktivität pro aufgenommener ^{14}C -Leucin-Menge (die Blätter nehmen, wie Abb. 19 zeigt, unter verschiedenen Bedingungen verschieden viel Lösung auf) wird diese Tendenz bestätigt. Außerdem ist aus Abb. 19 ersichtlich, daß isolierte Blätter während mehrtägiger Versuchsdauer laufend Nährlösung aufnehmen, ohne allerdings das ganze dabei aufgesogene ^{14}C -Leucin ins

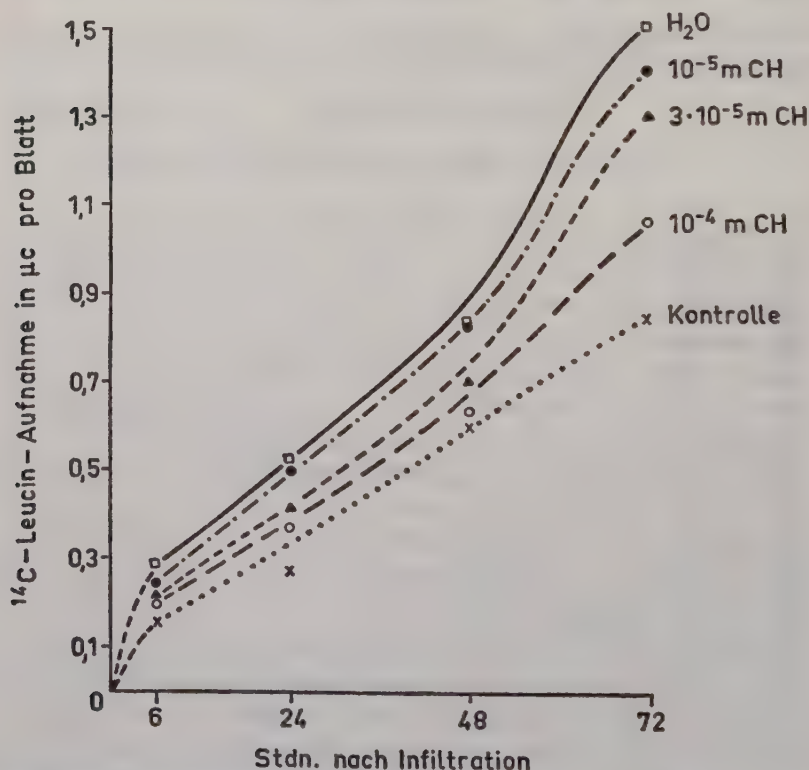


Abb. 19: ^{14}C -Leucin-Aufnahmerate pro Blatt bei ständiger Fütterung ($1 \mu\text{C}$ ^{14}C -Leucin pro 10 ml Nährlösung).

Protein einzubauen; der ^{14}C -Einbau beträgt nämlich nur $\frac{1}{4} - \frac{1}{3}$ der bei Pulsmarkierung (Abb. 16) erhaltenen Werte.

b) CH in an der Pflanze reagierende Blätter

Nachdem damit auch geklärt war, daß eine CH-Infiltration die vom Blatt aufgesaugte Leucinmenge nur leicht verringert, sollte nun geprüft werden, wie CH die Proteinsynthesekapazität in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit beeinflusst. Dazu wurden die Blätter an der Pflanze mit verschiedenen CH-Konzentrationen infiltriert, nach verschiedenen Zeiten abgeschnitten und jeweils mit $1\ \mu\text{C}$ ^{14}C -Leucin gefüttert; die Einbauzeit für diese „Puls“-Markierung betrug 24 Std.

aa) Proteinmenge

Die Proteingehalte der Blätter, die verschieden lang unter CH-Wirkung an der Pflanze reagierten, zeigen keine signifikanten Unterschiede zu den Werten an isolierten Blättern (Abb. 15), wenn man von niedrigeren Anfangswerten bei $3 \cdot 10^{-5}\ \text{m}$ und $10^{-4}\ \text{m}$ CH absieht.

bb) ^{14}C -Gabe zu verschiedenen Zeiten nach CH-Infiltration

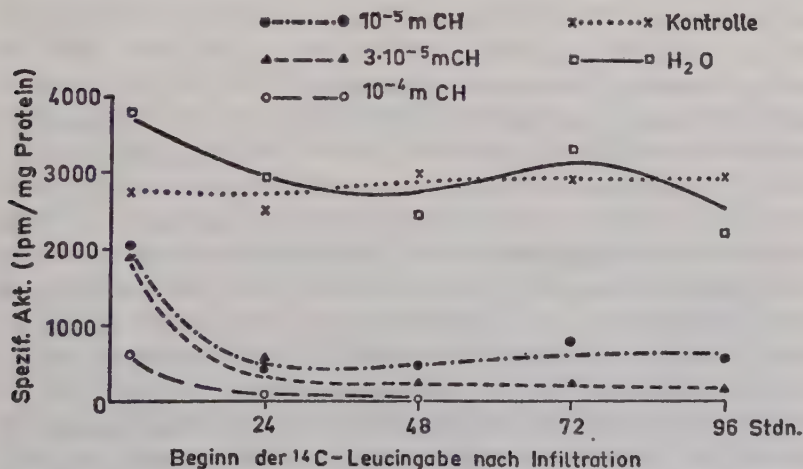


Abb. 20: ^{14}C -Leucin-Einbau in die löslichen Proteine der Blätter zu verschiedenen Zeiten nach CH-Infiltration an der Pflanze. Die Einbauzeit des ^{14}C -Leucins ($1\ \mu\text{C}$) betrug 24 Std.

Die in Abb. 20 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen, daß schon nach kurzzeitiger CH-Wirkung im Blatt an der Pflanze der Einbau von neu angebotenem markiertem Leucin ins Protein drastisch erniedrigt wird. Nach 24stündiger Einwirkung erreicht er nur noch 3 % (bei 10^{-4} m CH) oder aber etwas über 15 % (bei 10^{-5} m CH und $3 \cdot 10^{-5}$ m CH) der Werte der Wasserkontrollen. Die Werte der unbehandelten Kontrolle und der Wasserkontrolle haben im späteren Verlauf dieses Versuchs etwa gleiche Einbauraten ins Protein; das bedeutet, daß der reine Infiltrationseffekt (anfänglich erhöhte ^{14}C -Leucin-Aufnahme!) nach wenigen Stunden abgeklungen ist.

Aus den Einbauwerten von Blättern an der Pflanze könnte man auf eine mit fortschreitender Zeit zunehmende Hemmung der Proteinsynthese durch steigende CH-Konzentrationen schließen, wenn nicht die Ergebnisse an isolierten Blättern dieser Folgerung widersprechen würden. So deuten unsere Befunde vor allem darauf hin, daß CH die Aufnahme von ^{14}C -Leucin in die Zelle, also letztlich das Transportsystem, beeinträchtigt; dabei nimmt der Gehalt an löslichen Proteinen pro Blattfläche z. T. erheblich zu.

3. Die Wirkung von 2-Thiouracil auf die Synthese löslicher Proteine

Von 2-TU ist seit HESS (1959) und HESLOP-HARRISON (1960) bekannt, daß es in die RNS der Blätter höherer Pflanzen eingebaut wird und dort — besonders in hohen Konzentrationen — als Inhibitor vieler Entwicklungsprozesse wirksam ist. Allerdings wird von 2-TU nicht nur über Hemmeffekte berichtet. So erhielten TUPY et al. (1965, 1966) mit 2-TU beim Pollenschlauchwachstum zwar einen Einbau des Antimetaboliten in die RNS, wobei die Proteinsynthese jedoch gesteigert, die RNS-Synthese allerdings gehemmt wurde. Die Ergebnisse von WOODSTOCK a. BROWN (1966) sowie HEYES a. VAUGHAN (1967), wonach 2-TU das Streckungswachstum der Wurzelsegmente von Erbsen stimulieren kann, ließen sich ebenfalls auf gesteigerte Proteinsynthese zurückführen, wobei auch hier der Einbau von 2-TU in die RNS erfolgte; nebenbei wurde erhöhte Atmung gemessen. Die Untersuchungen von POZSAR a. BELA (1969) zeigten sogar, daß 2-TU sowohl die RNS- als auch die DNS-Biosynthese in Bohnenblättern induzieren und stimulieren kann. Dagegen erreichten BRONCHART, BERNIER, KINET a. HAVELANGE (1970) im apikalen Meristem von *Sinapis alba* durch 2-TU

eine Hemmung der RNS-Synthese. Die Wirkung von 2-TU scheint allgemein durch Uracil revertierbar zu sein.

Zusätzlich zu diesen z. T. unterschiedlichen Wirkungen hat sich 2-TU als induzierendes Agens der Blütenbildung bei Infiltration in das Blatt von *H. n.* herausgestellt. Diese Befunde veranlaßten uns, die Beeinflussung der Proteinsynthese in den Blättern von *H. n.* durch 2-TU zu untersuchen.

a) 2-TU in isolierte Blätter

Die Blätter wurden abgeschnitten, mit 2-TU verschiedener Konzentration infiltriert, sofort mit je $1\ \mu\text{C}\ ^{14}\text{C}$ -Leucin gefüttert, danach in Nährlösung gestellt und die Versuche zu verschiedenen Zeiten abgebrochen.

aa) Proteinmenge

Die Kinetik der löslichen Proteine dieser Versuchsreihe ist in Abb. 21 dargestellt.

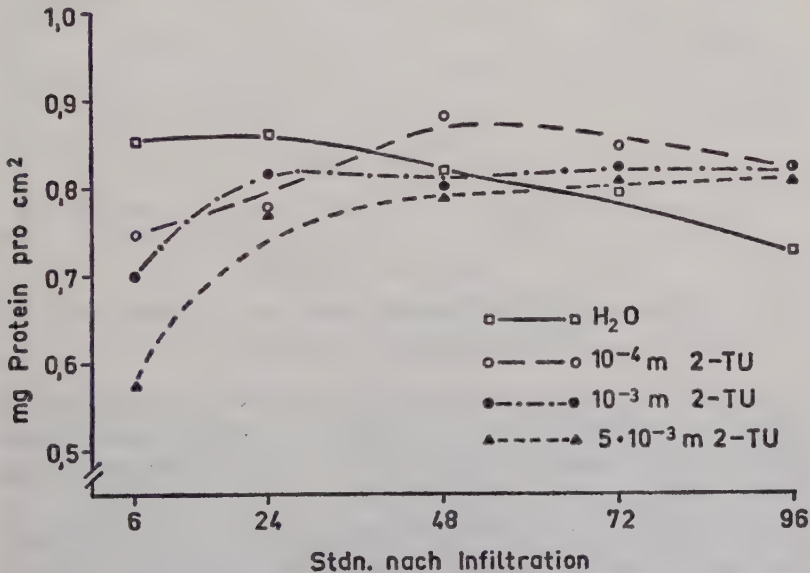


Abb. 21: Gehalt an löslichen Proteinen isolierter Blätter zu verschiedenen Zeiten nach Infiltration mit 2-TU.

Die lösliche Proteinmenge pro cm^2 wird unter der Wirkung von 2-TU in den ersten 24 Std. mit steigender Konzentration erniedrigt und ist beträchtlich geringer als die der Kontrolle. Da der Proteingehalt der Wasserkontrolle mit fortlaufender Versuchsdauer leicht abfällt, bei 2-TU-Infiltration nach dem Anfangswert jedoch steil ansteigt und später fast konstant bleibt, so resultiert daraus für die 2-TU-Proben bei langer Versuchszeit ein höherer Gehalt an löslichen Proteinen.

bb) ^{14}C -Gabe sofort nach Infiltration von 2-TU

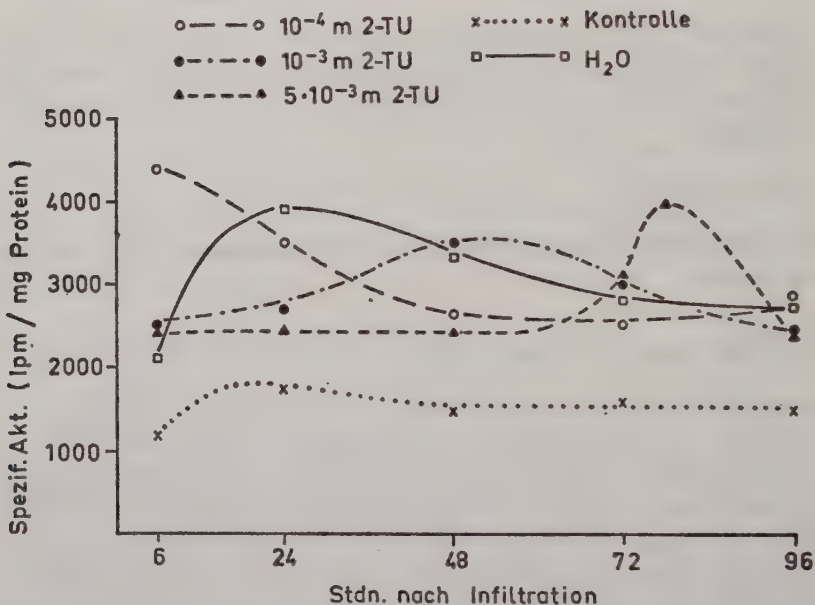


Abb. 22: ^{14}C -Einbau ins Protein isolierter Blätter nach Infiltration von 2-TU bei gleichzeitiger ^{14}C -Leucin-Gabe.

Aus Abb. 22 ist zu ersehen, daß bei 10^{-4} m 2-TU der ^{14}C -Einbau in den ersten 6 Std. nach Infiltration stark erhöht ist; danach nimmt die spezifische Aktivität jedoch ab, fällt unter die der Wasserkontrolle und nähert sich ihr im späteren Verlauf wieder.

Die Konzentration 10^{-3} m 2-TU induziert ab 6 Std. einen weiteren, allerdings nur leichten Anstieg der spezifischen Aktivität bis zu 48 Std.; danach gleichen sich die Werte allmählich denen der Wasserkontrolle an. Der ^{14}C -Einbau bei $5 \cdot 10^{-3}$ m 2-TU scheint zwischen 6 und 48 Std.

vollständig gehemmt; nach 72 Std. wird jedoch die ^{14}C -Fixierung ins lösliche Protein kurzzeitig stark stimuliert – wenige Stunden später schließt sich allerdings eine erhöhte Abnahme der spezif. Aktivität an (bei gleichbleibendem Proteingehalt), so daß der 96-Stunden-Wert auf der Höhe der Wasserkontrolle liegt.

Im Gesamtbild sind trotz einer allgemeinen Hemmung des ^{14}C -Einbaus durch 2-TU in den einzelnen Kurven spezifische Gipfel zu verzeichnen: bei 10^{-4} m 2-TU etwa um 6 Std., bei 10^{-3} m um 48 Std. und bei $5 \cdot 10^{-3}$ m um 80 Std., d. h. je stärker die 2-TU-Konzentration, desto weiter ist das Einbaumaximum vom Infiltrationszeitpunkt entfernt.

Aus diesem Versuch haben wir die spezifischen Aktivitäten zusätzlich in % der Wasserkontrolle berechnet (Abb. 23).

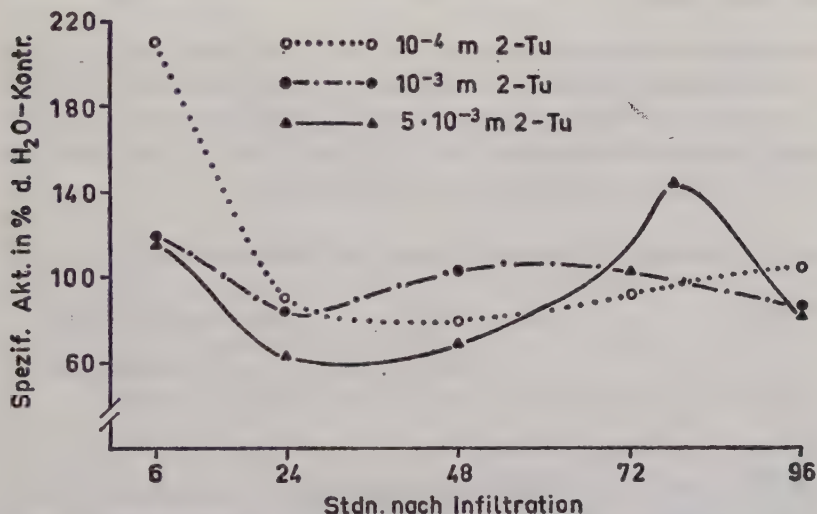


Abb. 23: Wie Abb. 21, nur in % der Wasserkontrolle umgerechnet.

Im Vergleich zu den Wasserkontrollen ist bei den durch 2-TU beeinflussten Proben nach einer anfänglichen Steigerung des ^{14}C -Einbaus eine Hemmung zu verzeichnen, die jedoch nach 24–48 Std. bei einigen Konzentrationen aufgehoben wird und sogar kurzzeitig von einer Stimulierung abgelöst werden kann; bei $5 \cdot 10^{-3}$ m 2-TU resultiert daraus eine bis zu etwa 45%ige Erhöhung über die Wasserkontrollwerte.

Insgesamt dokumentieren die Versuchsreihen mit 2-TU, daß bei ^{14}C -

Gabe sofort nach Infiltration in isolierten Blättern trotz einer gewissen Hemmung des spezifischen Einbaus zu bestimmten Zeiten eine kurz andauernde Stimulierung zu verzeichnen ist, wobei auch der lösliche Proteingehalt im Blatt ansteigt, was auf eine De-novo-Synthese hindeutet.

b) 2-TU in an der Pflanze reagierende Blätter

Die an der Pflanze mit 2-TU infiltrierten Blätter werden nach verschiedenen Zeiten abgeschnitten, mit $1 \mu\text{C}$ ^{14}C -Leucin gefüttert und nach 6 bzw. 24 Std. Einbauzeit Proteingehalt sowie ^{14}C -Markierung des Proteins gemessen.

aa) Proteinmenge

Der Gehalt an löslichen Proteinen pro Blattfläche steigt bis zu 30 Std. nach Infiltration bei mit 2-TU infiltrierten Blättern gegenüber der Wasserkontrolle an und bleibt danach nahezu konstant: Bei 10^{-3} m 2-TU liegt dann der Proteingehalt um 20 %, bei $5 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ 2-TU um etwa 40 % über dem der Wasserkontrolle (keine Abb.).

bb) ^{14}C -Gabe zu verschiedenen Zeiten nach Infiltration von 2-TU

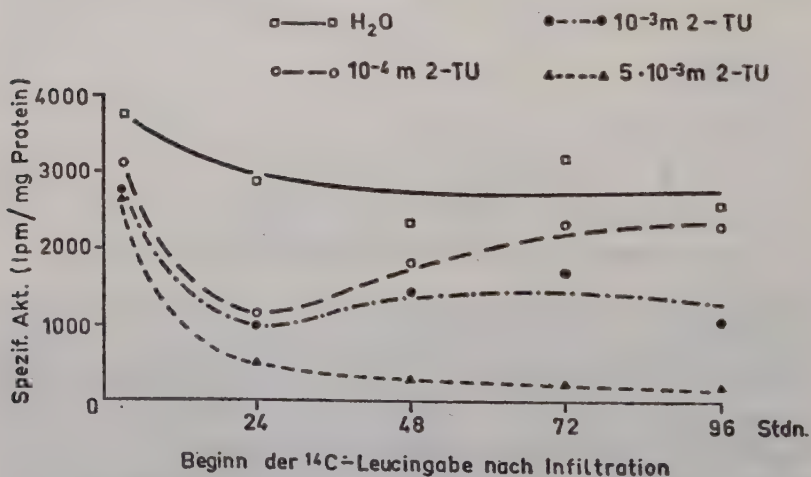


Abb. 24: Einbau von ^{14}C -Leucin in Proteine von mit 2-TU an der Pflanze reagierenden Blättern. Einbauzeit des ^{14}C -„Pulses“ jeweils 24 Std.

Wie aus Abb. 24 hervorgeht, hemmt 2-TU schon bei ^{14}C -Leucin-Zugabe wenige Stunden nach Infiltration dessen Einbau ins Protein. Diese bei allen Konzentrationen zu beobachtende Hemmung nimmt bei der höchsten Konzentration ($5 \cdot 10^{-3} \text{ m}$) im weiteren Verlauf noch zu, während sie bei den niedrigeren Konzentrationen ab 24 Std. z. T. langsam nachläßt.

Bei einer Einbauzeit von 6 Std. für den ^{14}C -Leucin-Puls werden die eben dargestellten Werte im wesentlichen bestätigt (Abb. 25).

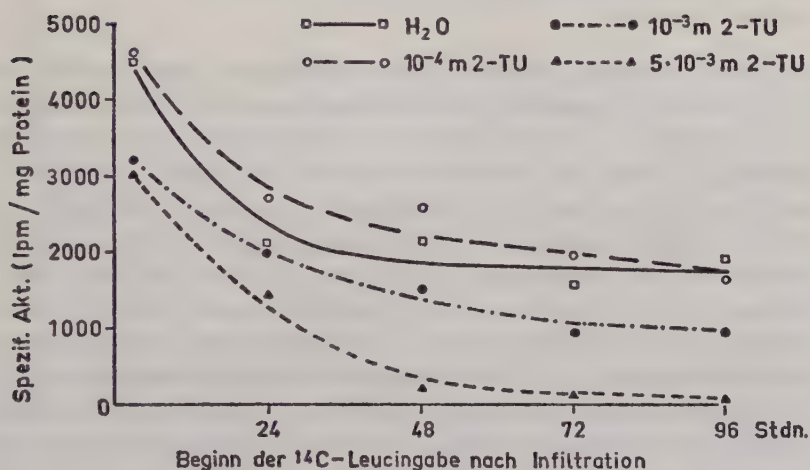


Abb. 25: Wie Abb. 24, jedoch 6 Std. Einbauzeit für den „Puls“.

Die Kurven fallen bei der kürzeren Einbauzeit in den ersten 48 Std. weniger steil ab als bei der Einbauzeit von 24 Std. Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich in der dadurch kürzeren Reaktionszeit für das 2-TU, weil bei 6stündiger Einbauzeit der Antimetabolit um 18 Std. weniger einwirken konnte als bei 24stündiger Einbauzeit; im späteren Verlauf dieser Versuchsreihe wird dieser Effekt kompensiert, denn bei Versuchszeiten von mehreren Tagen hat die Einbauzeit (6 bzw. 24 Std.) so gut wie keinen Einfluß mehr auf die Einwirkungszeit für das 2-TU, hier gleichen sich die Werte auch annähernd an. Die Ergebnisse mit kurzer Einbauzeit für den ^{14}C -„Puls“ ergeben außerdem, daß die Hemmwirkung von 2-TU für den Leucineinbau nicht kurzfristig voll ein-

setzt, sondern daß sie in einem über 24 Std. dauernden Prozeß erst ihre volle Stärke erreicht.

Auch bei 2-TU treten also zwischen den Bedingungen: ^{14}C -Gabe sofort nach Infiltration und ^{14}C -Gabe zu verschiedenen Zeiten nach Infiltration divergierende Ergebnisse auf. Das läßt vermuten, daß 2-TU (wie schon CH) im Blatt von *H. n.* letztlich die Aufnahme des ^{14}C -Leucins in die Zelle beeinflußt.

4. Die Wirkung von Chloramphenicol auf die Synthese löslicher Proteine

Von CAP ist bekannt, daß es – wie schon bei den Atmungsversuchen (I/3) erwähnt – spezifisch die Proteinsynthese an 70 S Ribosomen hemmt (BÜCHER u. SIES 1969) und außerdem die oxydative Phosphorylierung entkoppelt (HANSON a. HODGES 1963). YOUNG a. NAKADA (1970) stellten eine lag-Phase der Proteinsynthese fest; sie schließen deshalb auch auf mögliche Änderungen am Ribosom, die eine Verzögerung der Proteinsynthese bewirken. Mit CAP geeigneter Konzentration kann also relativ selektiv festgestellt werden, inwieweit eine Blockierung der 70 S Ribosomen in den Blättern die Gesamtproteinsynthese beeinflußt, oder aber, wie spezifisch Chloroplastenribosomen – und damit Photosyntheseaktivität (MARGULIES a. BRUBAKER 1970) – und mitochondriale Ribosomen bei ihrer Synthese beeinträchtigt werden.

Als optimale Konzentration in bezug auf die Verträglichkeit für die Blätter von *H. n.* (beim Blühversuch getestet) erwies sich 10^{-4} m.

a) CAP in isolierte Blätter

Die abgeschnittenen Blätter wurden mit 10^{-4} m CAP infiltriert, sofort mit $1\ \mu\text{C}$ ^{14}C -Leucin gefüttert, dann in Nährlösung gestellt und nach verschiedenen Zeiten Proteingehalt und ^{14}C -Einbau gemessen.

Der Proteingehalt der mit CAP infiltrierten Blätter liegt zwar meist leicht über dem der Wasserkontrolle, die Unterschiede sind aber zu gering, um eine definitivere Aussage machen zu können (keine Abb.).

Bei ^{14}C -Gabe sofort nach Infiltration und Messung des ^{14}C -Einbaus in

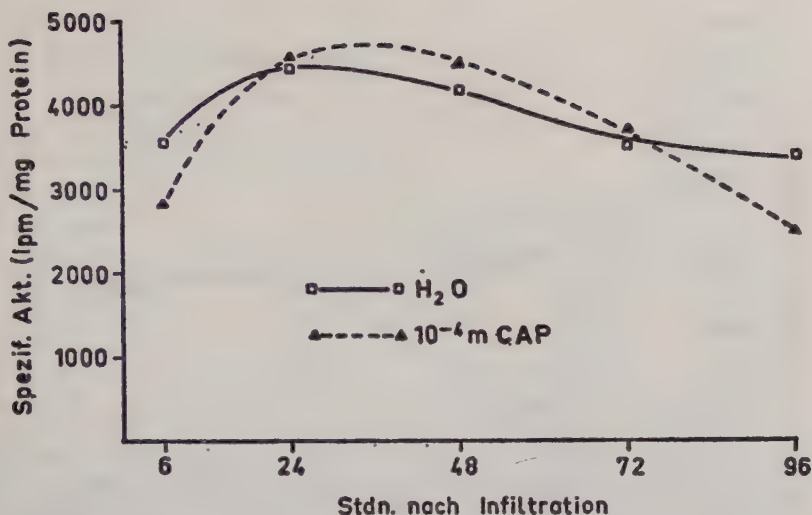


Abb. 26: ^{14}C -Einbau ins Protein isolierter Blätter nach Infiltration von 10^{-4} m CAP bei sofortiger ^{14}C -Leucin-Gabe.

die Proteine zu verschiedenen Zeiten nach Infiltration (Abb. 26) ist deutlich erkennbar, daß der Proteinsynthesehemmstoff CAP den Einbau von ^{14}C -Leucin ins Protein so gut wie nicht beeinflußt; es läßt sich nur eine geringe zeitliche Verzögerung gegenüber der Wasserkontrolle um ca. 12 Std. feststellen. Nach 72 Std. fällt die Markierung allerdings stark ab (um fast 30 % im Vergleich zur Wasserkontrolle), wofür vielleicht sekundäre „Gift“-wirkungen des CAP verantwortlich sind.

b) CAP in an der Pflanze reagierende Blätter

CAP wurde in Blätter an der Pflanze infiltriert, diese nach verschiedenen Zeiten abgeschnitten und mit $1 \mu\text{C}$ ^{14}C -Leucin gefüttert; die Einbauzeit betrug 24 Std.

Der Gehalt an löslichen Proteinen zeigte bei dieser Versuchsanordnung nur geringe Schwankungen und zwischen den CAP- und den Wasserkontrollen praktisch keinen Unterschied.

Bei ^{14}C -Gabe zu verschiedenen Zeiten nach Infiltration von CAP wird außer einer anfänglich etwas stimulierten Aufnahme von ^{14}C -Leucin

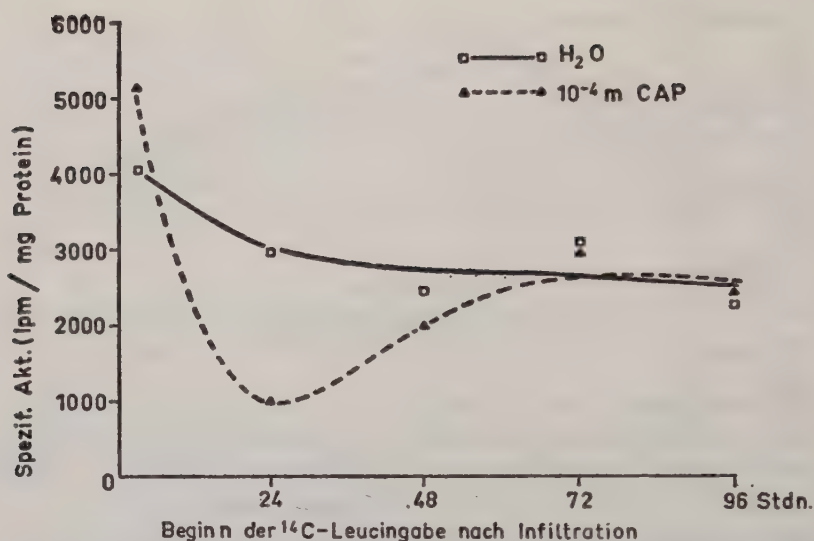


Abb. 27: Spezifische Aktivität der Proteine bei ^{14}C -Gabe zu verschiedenen Zeiten nach CAP-Infiltration in Blätter an der Pflanze. Die Einbauzeit betrug 24 Std.

(Abb. 27) die bei isolierten Blättern festgestellte verzögernde Wirkung auf den Einbau durch diese Versuche gestützt; die zwischen 6 und 24 Stunden nach Infiltration auftretende Hemmung nimmt im weiteren Verlauf ab, und ab 72 Std. sind die Werte gleich denen der Wasserkontrolle (vergl. lag-Phase bei YOUNG a. NAKADA 1970).

5. Die Wirkung verschiedener Photoperioden auf die Synthese löslicher Proteine

Zur Prüfung einer eventuellen Beteiligung des Proteinstoffwechsels an der Induktion der Blütenbildung sollten der Proteingehalt und der ^{14}C -Leucin-Einbau auch bei und nach verschiedenen photoperiodischen Bedingungen untersucht werden.

a) Verschiedene Photoperioden bei isolierten Blättern

Von im KT stehenden Pflanzen wurden Blätter abgeschnitten, mit $1\ \mu\text{C}$ ^{14}C -Leucin gefüttert und anschließend in reiner Nährlösung den verschiedenen Photoperioden ausgesetzt.

Bei allen Störlichtversuchen wurde weißes Störlicht gegeben.

aa) Proteinmenge

Die Kinetik des löslichen Proteins ist in Tab. 15 zusammengestellt.

Tab. 15: Proteingehalte von zur Photoinduktion abgeschnittenen Blättern. Werte in mg Protein pro cm² Blattfläche.

Bedingungen	mg Protein/cm ² nach			
	24 Std.	48 Std.	72 Std.	96 Std.
KT	0,47	0,48	0,46	0,47
SL	0,37	0,39	0,45	0,44
LT	0,49	0,48	0,47	0,49
DL	0,51	0,52	0,54	0,55

Daraus ist zu ersehen, daß die Proteinwerte der SL-Proben schon nach 24 Std. deutlich abfallen, sich aber nach 72 Std. wieder denen der Kontrolle angleichen. Möglicherweise hemmt also das 1¹/₂stündige Störlicht kurzzeitig die Proteinsynthese oder es führt zu einer Umwandlung von löslichen Proteinen in Strukturproteine. Unter LT-Bedingungen wird der Proteingehalt leicht erhöht. Dieser Effekt wird unter DL noch verstärkt: Die Werte sind hierbei bis zu etwa 20 % gegenüber den KT-Kontrollen erhöht. Diese Erhöhung läßt sich vielleicht mit der längeren Belichtungszeit erklären, wodurch über eine stärkere Anlieferung von Assimilationsprodukten auch die Proteinsynthese zunehmen könnte (vergleiche GULICH 1960); gegen diese Erklärung spricht allerdings, daß dieser Effekt bei den Blättern im LT (also ebenfalls längerer Belichtungszeit) kaum auftritt.

bb) ¹⁴C-Gabe zu Beginn verschiedener Photoperioden

Wie aus Abb. 28 hervorgeht, liegen die Werte der Pflanzen unter photoperiodisch induktiven Bedingungen weit über denen der KT-Kontrollen, variieren jedoch untereinander recht erheblich. Unter 16stündigem LT erreicht der Einbau nach 24 Std. sein Maximum, das ca. 350 % (!) der KT-Kontrolle beträgt; die spez. Aktivität fällt dann langsam bis zum 96-Std.-Wert auf ca. 250 % der Blätter der Kontrolle ab. Die SL-Kurve verläuft ähnlich wie die LT-Kurve, nur ist bei ihr der ¹⁴C-Einbau geringer. Die unter DL-Bedingungen erhaltenen Werte folgen bis 48 Std. nach Versuchsbeginn annähernd dem Kurvenverlauf der beiden anderen Photoperioden; der ¹⁴C-Einbau ist jedoch etwas geringer: Er beträgt

im Mittel 175 % der KT-Kontrolle. Nach 48 Std. setzt jedoch ein erneuter Netto-Einbau ein, und die spezifische Aktivität erreicht nach 96 Std. bei steigender Tendenz eine um 300 % über der der Kontrolle liegenden Quote.

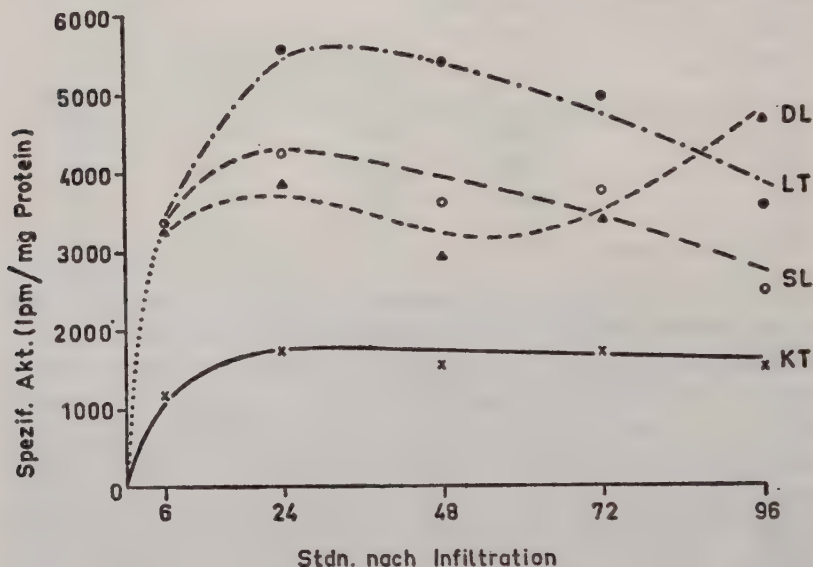


Abb. 28: Einbaureate von ^{14}C -Leucin ins Protein unter verschiedenen Photo-perioden; die induktiven Bedingungen wurden den isolierten, mit ^{14}C -Leucin gefütterten Blättern gegeben.

cc) Ständige Gabe von ^{14}C -Leucin

Füttert man den Blättern während der gesamten Versuchsdauer ständig ^{14}C -Leucin in gleichbleibender Konzentration ($1 \mu\text{c}/10 \text{ ml}$ Nährlösung), so erhält man die in Abb. 29 dargestellten Ergebnisse.

Auffallend ist der steile Anstieg der LT-Kurve.

Die Werte unter SL-Bedingungen zeigen ebenfalls steigenden ^{14}C -Einbau; er ist zwar im Vergleich zu den LT-Proben geringer, liegt aber noch erheblich über dem der KT-Kontrollen. Bezieht man den ^{14}C -Einbau ins Protein auf die aufgenommene ^{14}C -Leucin-Menge, so zeigt sich auch hier ein verstärkter Anstieg der spezifischen Aktivität bei LT-Bedingungen (keine Abb.).

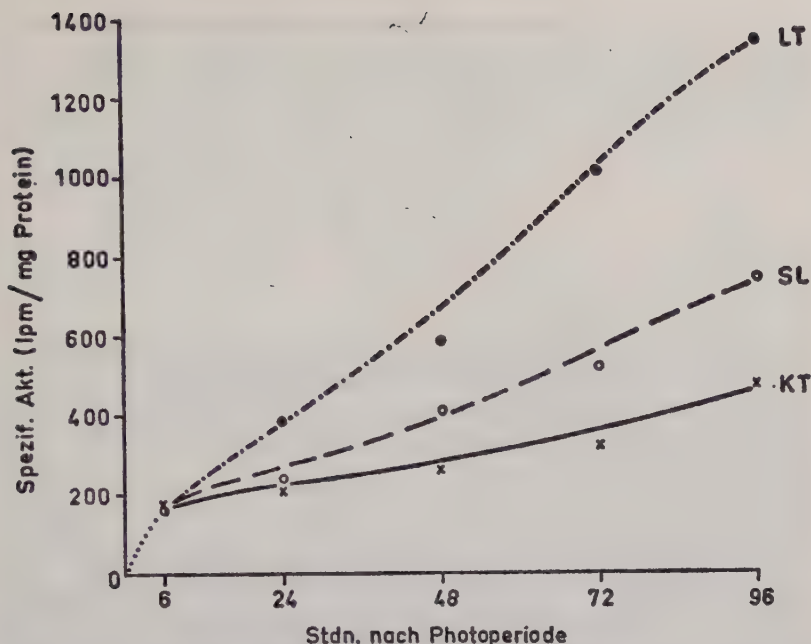


Abb. 29: ^{14}C -Leucin-Einbau ins Protein während verschiedener photoperiodischer Bedingungen bei ständiger Fütterung mit ^{14}C -Leucin ($1 \mu\text{C}/10 \text{ ml}$ Nährlösung).

Die gefundenen Daten lassen klar erkennen, daß die Blätter von H. n. unter photoperiodisch induktiven Bedingungen auch bei fortschreitender Versuchsdauer laufend ^{14}C -Leucin aufnehmen und ins Protein einbauen können, wenngleich auch hier – wie schon bei CH-Behandlung – die ^{14}C -Einbauraten wesentlich geringer sind als bei Pulsmarkierung (Abb. 28).

b) Verschiedene Photoperioden bei an der Pflanze reagierenden Blättern
Blätter an der Pflanze wurden verschiedenen photoperiodischen Bedingungen ausgesetzt, dann zu verschiedenen Zeiten abgeschnitten und mit $1 \mu\text{C}$ ^{14}C -Leucin gefüttert. Der Einbau der Aminosäure ins Protein erfolgte unter den entsprechenden photoperiodischen Bedingungen in einem Zeitraum von 6 oder 24 Std. (= Einbauzeit).

Die Menge an löslichen Proteinen pro Blattfläche in Abhängigkeit von der Dauer der photoperiodischen Behandlung ist im wesentlichen die gleiche wie die bei isolierten Blättern (siehe Tab. 15).

Der ^{14}C -Einbau ins Protein zu verschiedenen Zeiten nach Versuchsbeginn – bei 24stündiger Einbauzeit des ^{14}C -Leucins – ergab die in Abb. 30 wiedergegebenen Ergebnisse.

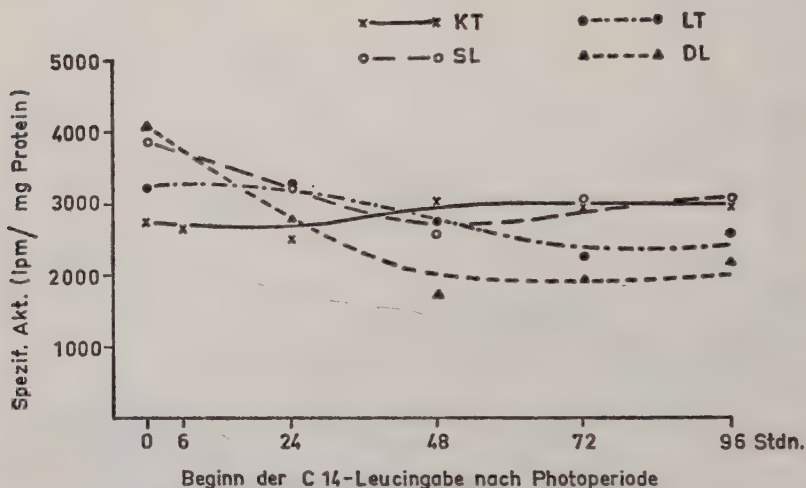


Abb. 30: ^{14}C -Einbau ins Protein zu verschiedenen Zeiten nach unterschiedlicher photoperiodischer Behandlung der Blätter an der Pflanze. Die Einbauzeit für ^{14}C -Leucin betrug 24 Std.

Nach anfänglich erhöhtem Einbau weisen Blätter unter DL-, LT- und SL-Bedingungen einen langgezogenen Abfall der spezifischen Aktivität auf (er beträgt bei DL etwas mehr als 30 % und bei LT maximal 25 % der Kontrolle), der sich jedoch nach 48 Std. nicht mehr weiter fortsetzt; bei SL-Bedingungen sind die Abweichungen gegenüber den Werten der KT-Kontrolle allerdings weniger auffällig.

Bei einer Einbauzeit von 6 Std. für das ^{14}C -Leucin wurden im wesentlichen die gleichen Ergebnisse erzielt, nur lagen die Einbauquoten wegen der kürzeren Einbauzeit etwas niedriger.

Als Ergebnis dieses Versuchs läßt sich feststellen, daß mit steigender Photoinduktion die ^{14}C -Leucin-Fixierung im Protein zu verschiedenen Zeiten nach Photoinduktion an der Pflanze erniedrigt, der Gehalt an löslichen Proteinen jedoch gesteigert wird.

6. Fraktionierung der löslichen Blattproteine

Um möglicherweise Ansatzpunkte für spätere Untersuchungen zu gewinnen, sollte geprüft werden, ob sich das Muster des Einbaus von ^{14}C -Leucin in verschiedene Proteinfractionen der Blätter während blüh-induktiver Bedingungen ändert.

a) Auftrennung in lösliche und ribosomale Proteine durch Ultrazentrifugation

Die hemmende Wirkung von CH auf die Proteinsynthese wird in der Literatur der Blockierung der Translokasereaktion am Ribosom zugeschrieben. Ergänzend dazu berichtet STANNERS (1966), daß bei niedrigen CH-Konzentrationen fast alle freien Ribosomen von Säugetierzellen (an Hamstern untersucht) zu Polysomen zusammengeschlossen vorliegen. Dabei wäre denkbar, daß sich das unter CH-Wirkung neu-synthetisierte Protein nicht von den Polysomenkomplexen löst und somit für die Folgereaktion im Stoffwechsel nicht verfügbar wäre, wobei gleichzeitig die Synthese an diesen Polysomen unterbrochen würde. Damit zusammen hängt die Frage, ob oder inwieweit ribosomales Protein unter diesen Bedingungen ^{14}C -Leucin einbauen kann.

Als einfachste analytische Methode zur Klärung dieses Komplexes bot sich die Ultrazentrifugation an. Der Rohextrakt der Blätter wurde wie bei den bisher beschriebenen Versuchen durch 2×30 minütiges Zentrifugieren bei $50\,000 \times g$ von den unlöslichen Zellbestandteilen befreit und mit dem Überstand die schon bekannten Bestimmungen von Proteingehalt und ^{14}C -Einbau durchgeführt. Ein Teil des Überstandes wurde zusätzlich 2 Std. bei $105\,000 \times g$ zentrifugiert; aus diesem Überstand erfolgte wiederum Bestimmung von Proteinmenge und Einbau von ^{14}C -Leucin ins lösliche Protein. Auf diese Weise haben wir im ersten Überstand leicht lösliches + ribosomales (bzw. ribosomal gebundenes) Protein zusammen und im ultrazentrifugierten Überstand fast ausschließlich leicht lösliche Proteine erfaßt und können somit feststellen, wie Mengenverhältnisse und spezifische Aktivitäten auf die beiden Proteinfractionen verteilt sind.

Das Mittel aus mehreren Vergleichsmessungen ist in der Tabelle 16 zusammengefaßt, wobei die Werte jeweils in % der $50\,000 \times g$ -Fraktion angegeben sind.

Tab. 16: Anteil der leicht löslichen Proteine und deren spezifischer Aktivität am mit 50 000 x g zentrifugierten Überstand von CH infiltrierten Blättern. Die Einwirkungszeit des CH betrug zwischen 48 und 72 Std.

Bedingungen	¹⁴ C-Gabe zu versch. Zeiten nach Infiltration		¹⁴ C-Gabe sofort nach Infiltration	
	mg Prot./cm ²	Spez. Akt.	mg Prot./cm ²	Spez. Akt.
H ₂ O	74 ± 5 %	105 %	63 ± 5 %	124 %
3 · 10 ⁻⁵ m CH	75 ± 3 %	103 %	70 ± 5 %	115 %
10 ⁻⁴ m CH	78 ± 5 %	99 %	—	—

Durch eine 2stündige Ultrazentrifugation bei 105 000 x g nimmt die Proteinmenge bei Blättern, die zu verschiedenen Zeiten nach CH-Infiltration an der Pflanze mit ¹⁴C-Leucin gefüttert wurden, um rund 25 % ab (das entspricht etwa dem erfahrungsgemäßen Abfall durch Abtrennung der Ribosomen); da aber im gleichen Verhältnis auch ¹⁴C-Radioaktivitätsverlust auftritt, bleibt die spezifische Aktivität weitgehend gleich.

Bei Blättern, die vor der Infiltration abgeschnitten wurden, bei denen also der Einbau von ¹⁴C-Leucin und das Einsetzen der CH-Wirkung gleichzeitig ablaufen, beträgt die Abnahme der Proteinmenge durch Ultrazentrifugation etwa 30 %, gegenüber 35 % der Wasserkontrolle. Bemerkenswert ist dabei die Zunahme der spezifischen Aktivität unter diesen Bedingungen. Die Steigerung deutet darauf hin, daß hier die abzentrifugierten ribosomalen bzw. organell gebundenen Proteine weniger spezifisch markiert wurden als die nach Ultrazentrifugation noch in Lösung verbliebenen Proteine. Allerdings sind die nach Wasserinfiltration in den Blättern synthetisierten leicht löslichen Proteine noch stärker markiert als die unter CH-Wirkung gebildeten. Das spricht nun dafür, daß die unter CH-Einfluß synthetisierten Proteine wahrscheinlich nur teilweise von den Ribosomen gelöst werden, oder aber, daß ribosomales Protein verhältnismäßig stark ¹⁴C-Leucin einbaut; beide Vorgänge könnten aber auch gleichzeitig ablaufen.

b) Fraktionierung durch Ammoniumsulfatfällung

Die Fraktionierung erfolgte mit Proteinen isolierter Blätter nach 72stün-

digem Einbau von 1 μC ^{14}C -Leucin unter CH-Einfluß; als Kontrollen wurden unbehandelte und wasserinfiltrierte Proben mitgeführt.

Der Überstand der $2 \times 50\,000 \times \text{g}$ -Zentrifugation wurde bei 4°C mit gesättigter Ammonsulfatlösung stufenweise auf den Sättigungsgrad 30, 50, 70 % gebracht und das restliche Protein mit TCA gefällt.

Tab. 17: Fraktionierung des Proteins isolierter Blätter durch Ammoniumsulfatfällung des Überstandes der $50\,000 \times \text{g}$ -Zentrifugation. Die Einbauzeit des ^{14}C -Leucin-Pulses betrug 72 Std.

Die Werte beziehen sich auf den ^{14}C -Einbau pro $1/25$ des Gesamtproteins.

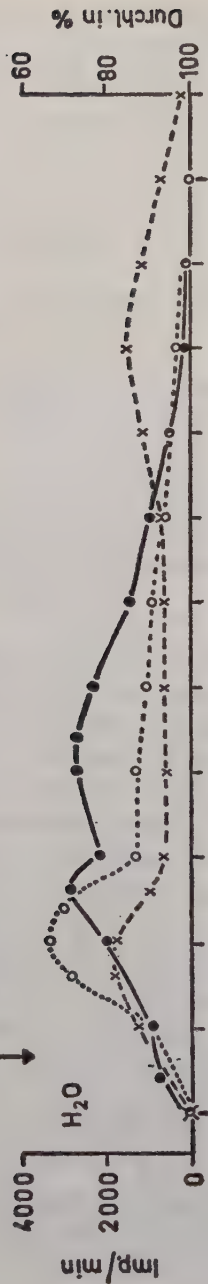
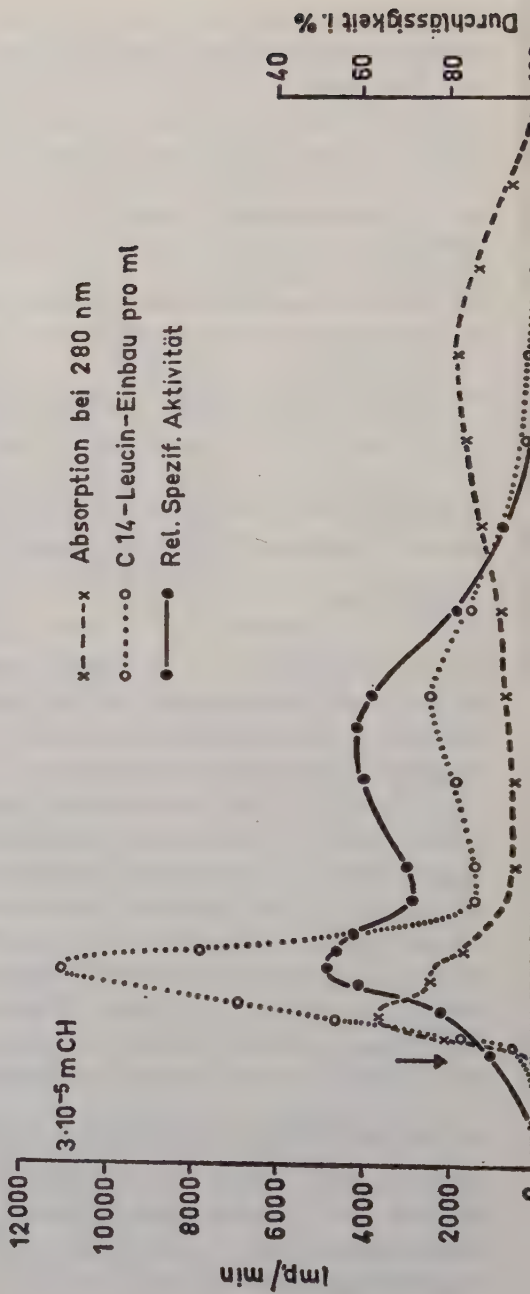
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ - Konzentration	Kontrolle Imp./Min.	H_2O Imp./Min.	$3 \cdot 10^{-5} \text{ m CH}$ Imp./Min.
30	840 = 29 %	610 = 11 %	1570 = 15 %
50	760 = 27 %	550 = 9 %	820 = 9 %
70	410 = 14 %	1050 = 18 %	1320 = 13 %
TCA	860 = 30 %	3710 = 62 %	6400 = 63 %
Spezif. Akt. d. Gesamtproteins	1860 lpm/mg Protein	3720 lpm/mg Protein	5620 lpm/mg Protein

Die Ergebnisse der Tab. 17 stellen wegen des zu großen mittleren Fehlers nur Näherungswerte dar; wir haben deshalb auf die Einzelberechnung der spezifischen Aktivität verzichtet. Trotzdem kann als Tendenz herausgestellt werden, daß bei infiltrierten Blättern der größte Teil der Radioaktivität in der letzten Fraktion – der TCA-Fällung – zu finden war, d. h. hier sind leicht wasserlösliche Proteine (Albumine?!) bevorzugt markiert worden, während bei den unbehandelten Kontrollen der Einbau auf alle Fraktionen verteilt war. Vergleicht man die durch CH-Infiltration erzielten ^{14}C -Einbauwerte mit den zugehörigen Kontrollwerten (die der wasserinfiltrierten Blätter!), so findet man prozentual keinen Unterschied; die Radioaktivität pro Fraktion ist aber bei CH-infiltrierten Proben stark erhöht. Ob wir es dabei mit spezifisch markierten Proteinen zu tun haben, sollte die nächste Versuchsreihe ergeben.

c) Trennung nach Molekulargröße – Gelfiltration mit Sephadex G 200

Abgeschnittene Blätter wurden infiltriert, sofort mit 2 μC ^{14}C -Leucin gefüttert und 72 Std. blühinduzierenden Bedingungen ausgesetzt. Die Elutionsdiagramme der Gelfiltration mit Sephadex G 200 sind in Abb. 31 dargestellt.

Dextran blau

3 · 10⁻⁵ m CH

x - - - x Absorption bei 280 nm
 o ····· o C 14 - Leucin - Einbau pro ml
 ● ———● Rel. Spezif. Aktivität

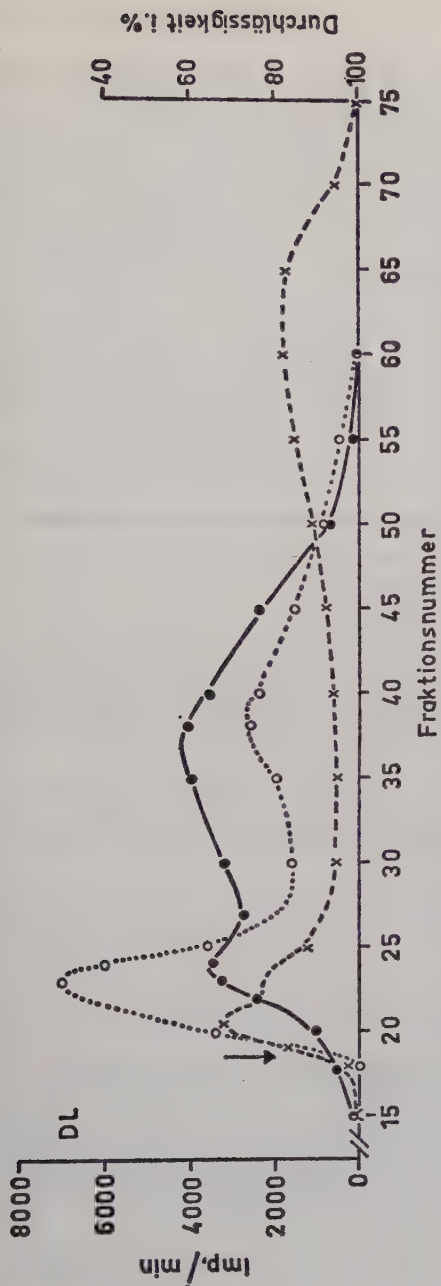


Abb. 31: Elutionsdiagramme (Sephadex G 200) der löslichen Proteine von isolierten Blättern von *H. n.* Die Einbauzeit des ^{14}C -Leucins betrug 72 Std. Elutionsvolumen pro Fraktion: 5 ml; davon wurde jeweils aus 1 ml die Radioaktivität gemessen. Bedingungen für die Blätter:

- a) Blätter mit Wasser infiltriert,
- b) Blätter mit $3 \cdot 10^{-5}$ m CH infiltriert,
- c) Blätter 72 Std. im DL.

aa) Vorbemerkungen:

Bevor die Ergebnisse der folgenden Versuche interpretiert werden, muß an die im methodischen Teil angedeuteten Schwierigkeiten bei der Proteinbestimmung nach der Gelfiltration erinnert werden: Wir haben keine gereinigten Proteine vorliegen, so daß auch andere Stoffe, die bei 280 nm absorbieren, die Messungen verfälschen könnten. Neben der Absorption bei 280 nm wurden deshalb noch Proteinbestimmungen mit Trichloressigsäure und Sulfosalycilsäure gemacht. Es ergab sich dabei, daß in den Elutionsfraktionen um Nummer 60 die nach den nephelometrischen Methoden erfaßten Proteinwerte weit geringer waren als die durch Absorption bei 280 nm ermittelten. Als eine Ursache stellte sich die schwache Eigenabsorption des Puffergemisches in diesem Fraktionsbereich heraus; eine Absorption weiterer Nichtproteine ist aber deshalb nicht auszuschließen. Nun sind der radioaktive Einbau und somit die Menge an neusynthetisierten Proteinen in dem genannten Kurvenabschnitt minimal (siehe Abb. 31), so daß dieser Bereich für die folgende Betrachtung keine Bedeutung hat.

Eine zusätzliche Prüfung des Reinheitsgrades der Proteine kann allgemein aus dem Verhältnis der Extinktionswerte der Proteinlösung bei 260 nm und 280 nm abgeleitet werden, wobei Koeffizienten, die größer als 2 sind, hohe Gehalte an Nucleinsäuren anzeigen.

In der folgenden Tabelle sind diese Verhältniszahlen für nach 72 Std. DL-Bedingungen extrahierte Blattproteinlösungen errechnet worden:

Fraktions- nummer	16	20	23	29	32	37	38	45	59	60	64
Verhältnis $\frac{260}{280}$ nm	1,5	1,55	1,1	1,73	1,79	1,77	1,9	1,68	1,53	1,65	1,54

Die Verhältnismerte schwanken, wie die Tabelle zeigt, zwischen 1,1 und 1,9, wobei die hohen Verhältniszahlen in den Bereich um Fraktion 38 (dem 2. Maximum der spezifischen Aktivitätskurve!) fallen; es könnte sich dabei um t-RNS handeln, die erfahrungsgemäß in diesem Bereich eluiert wird.

bb) Vergleich der Kurven

Absorptionskurven:

Die nach 72stündiger Behandlung mit verschiedenen Bedingungen vorhandenen Proteine absorbieren bei allen Proben maximal zwischen Fraktion 18 und 30, allerdings sind die Absorptionsgipfel bei $3 \cdot 10^{-5}$ m CH und DL wesentlich deutlicher ausgeprägt, als der der Wasserkontrolle: Während bei den induzierten Proben neben einem steilen Gipfel bei Fraktion 21 noch um Fraktion 23/24 eine Absorptionsschulter zu verzeichnen ist, weist die Kurve der Kontrolle nur einen flachen, breiten Gipfel um Fraktion 23 auf. Die absoluten Proteingehalte entsprechen den in Abb. 15 dargestellten Werten.

^{14}C -Leucin-Einbaukurven:

Die Einbaukurven der induzierten Proben unterscheiden sich im 1. Maximum von der Kontrolle hauptsächlich quantitativ, wobei vor allem der spitz zulaufende Gipfel der $3 \cdot 10^{-5}$ -m-CH-Bedingung auffällt; der entsprechende Gipfel unter DL ist ebenfalls stark erhöht, aber etwas breiter angelegt. Das Maximum der Kontrolle ist dagegen nur schwach ausgebildet und leicht nach rechts verschoben. Im zweiten Maximum des ^{14}C -Einbaus zeigen sich auch qualitative Unterschiede, denn nur bei CH und DL tritt ein zweiter Gipfel im Kurvenverlauf auf, nicht jedoch bei den Wasserkontrollen.

Kurven der relativen spezifischen Aktivität:

Die relativen spezifischen Aktivitäten sind zur Verdeutlichung nochmals in Abb. 32 zusammengestellt.

Im 1. Maximum unterscheiden sich CH- und DL-Bedingungen untereinander nur durch die absolute Höhe der Werte; gegenüber der Wasserkontrolle ist aber bei beiden die Lage des Gipfels deutlich nach links versetzt. Damit ergibt sich im Bereich der Fraktion 23–25 bei durch CH-Infiltration und DL induzierten Blättern ein verstärkter ^{14}C -Einbau bzw. eine erhöhte Proteinneusynthese gegenüber den Kontrollen – also ein qualitativer Unterschied. Da diese hochmarkierten Stoffe auf der Sephadexsäule sehr frühzeitig eluiert werden, handelt es sich wahrscheinlich entweder um hochmolekulare Proteine (MG um 700 000) oder um Pro-

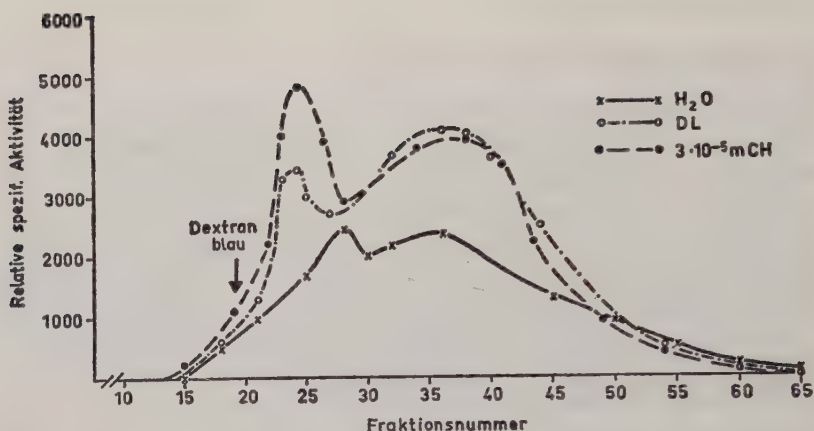


Abb. 32: Vergleich der relativen spezifischen Aktivitäten aus Abb. 32 a-c.

teine der Ribosomenuntereinheiten bzw. -bruchstücke und damit verbundene Proteinketten ähnlicher Größenordnung.

Im 2. Maximum unterscheiden sich dann die Kurven der relativen spezifischen Aktivität nur durch die Höhe des ¹⁴C-Einbaus, der auch hier für induzierte Proben wesentlich stärker ist und somit auf erhöhte Neusynthese schließen läßt.

Aus diesen Daten ist zu ersehen, daß bei der Blühinduktion in den Blättern von *H. n.* bestimmte Proteine spezifisch markiert bzw. synthetisiert werden, wodurch ein Zusammenhang zwischen Blütenbildung und Proteinsynthese wahrscheinlich wird.

D. DISKUSSION

Bei der qualitativen LTP *Hyocymus niger* wird durch das Antibiotikum Cycloheximid (CH) in bestimmter Konzentration bei Infiltration in die Blätter im KT Blütenbildung ausgelöst. Appliziert man jedoch CH auf den Vegetationspunkt, so wird damit nicht nur keine Blütenbildung induziert, sondern sogar die über die Blätter sowohl durch CH als auch durch photoperiodische Reaktionen ausgelöste Induktion weitgehend gehemmt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Befunden, die EICHHOFF u. RAU (1969) mit dem Basenanalogen 2-TU an der gleichen Pflanze erzielten. Die beiden Antimetabolite bewirken demnach gleichartige, im Blatt und am Vegetationspunkt in Beziehung auf die Blütenbildung entgegengesetzte Reaktionen. Auch die in keinem Fall erreichte 100%ige Auslösung der Blütenbildung mit Antimetaboliten ließe sich dadurch erklären, daß aus den Blättern ein Teil des infiltrierten Antimetaboliten zum Vegetationspunkt gelangt und dort die Induktion abschwächt. Einen weiteren Hinweis in diese Richtung geben die Versuche mit Mehrfachinfiltration (vergleiche Tab. 8), bei denen mit zunehmender Zahl von Infiltrationen die Blütrate abnimmt, was bedeuten könnte, daß immer mehr „freies“ CH den Vegetationskegel erreicht. Vom Vegetationspunkt wissen wir aber u. a. durch zahlreiche Versuche mit Hemmstoffen bei verschiedenen KTP und LTP, daß mit großer Wahrscheinlichkeit sowohl der Nucleinsäure- als auch der Proteinstoffwechsel bei der Realisation der Blütenbildung entscheidend beteiligt sind (zusammenfassende Literatur bei UMEMURA a. OOTA 1965; BRONCHART, BERNIER et al. 1970; siehe auch Einleitung).

Wie läßt sich aber nun erklären, daß die als Hemmstoffe bzw. Antimetabolite der Proteinsynthese bekannten Substanzen CH und 2-TU im Blatt eine positive Wirkung auf die Induktion der Blütenbildung ausüben? Hier stellt sich zunächst die Frage, auf welche Prozesse im Blatt von *H. n.* die beiden Stoffe überhaupt hemmend wirken. Dabei muß man zwischen Wirkungen von hohen und niedrigen Konzentrationen unterscheiden.

Hohe Konzentrationen der Antimetabolite erwiesen sich als allgemein schädigend. So wird z. B. bereits bei einer CH-Konzentration von 10^{-4} m der ^{14}C -Einbau ins Protein bei allen getesteten Bedingungen schon nach 6stündiger CH-Vorinkubation radikal herabgesetzt und kommt wenig später fast völlig zum Erliegen; auch die Sauerstoffaufnahme wird stark gehemmt. Die Blätter sterben nach einigen Tagen ab, Blühinduktion tritt nicht ein. Für 2-TU sind über 10^{-2} m ähnliche Ergebnisse zu verzeichnen.

Niedrigere Konzentrationen von CH und 2-TU fördern dagegen bestimmte Reaktionen im Blatt von *Hyoscyamus niger*; sie bewirken keine direkte bzw. ausschließliche Hemmung der Synthese löslicher Proteine. Unsere Werte lassen vielmehr den Schluß zu, daß eine Vorinkubation mit diesen Antimetaboliten zwar den ^{14}C -Leucin-Einbau ins lösliche Protein mit fortschreitender Zeit hemmt, daß aber schon aufgenommenes ^{14}C -Leucin fortwährend und verstärkt in lösliche Proteine eingebaut wird, wobei auch der Gehalt an löslichen Proteinen erhöht wird. Gestützt werden diese Werte durch Versuche mit ständiger ^{14}C -Gabe nach CH-Infiltration, bei denen zwar laufend erhebliche Mengen von ^{14}C -Lösung vom Blatt aufgesogen werden (Abb. 19), aber nur zu einem geringen Teil (im Vergleich zur einmaligen „Pulsgabe“) im löslichen Protein fixiert werden.

Bei der Untersuchung der damit zusammenhängenden Fragen haben wir schwerpunktmäßig mit dem Antibiotikum CH gearbeitet, das in der Literatur allgemein als spezifischer Hemmstoff der Proteinsynthese bezeichnet wird. Unsere mit induzierenden CH-Konzentrationen erzielten Ergebnisse scheinen demnach auf den ersten Blick im Gegensatz zu den Angaben der meisten Autoren zu stehen, die CH als obligaten Proteinsynthesehemmstoff, genauer der Transferase am 80 S Ribosom, beschreiben. Tatsächlich hat eine Reihe von Arbeitsgruppen eine solche Hemmung durch CH meist jedoch nur aus einem verminderten ^{14}C -Einbau ins Protein geschlossen, ohne danach zu fragen, ob die angebotene ^{14}C -Quelle überhaupt aufgenommen wurde bzw. werden konnte (Literatur siehe TASCA a. HILLMANN 1970).

Daneben wurde eine eventuelle Änderung des Proteingehaltes unseres Wissens nicht gemessen, obwohl durch Erfassen von Zu- oder Abnahme der Proteinmenge eine zusätzliche Absicherung der ^{14}C -Einbau-

werte möglich werden kann. Außerdem liegen kaum Ergebnisse vor, bei denen erst nach oder gleichzeitig mit der ^{14}C -Aminosäuregabe das CH verabreicht wurde, um dadurch eine reine Aufnahmehemmung bzw. Transportstörung durch den Antimetaboliten weitestgehend ausschließen zu können. Ausschlaggebend dürfte jedoch sein, daß die meisten Versuche, bei denen sich CH als Proteinsynthesehemmstoff herausstellte, an zellfreien Systemen, also in-vitro oder/und an niederen Organismen (*Saccharomyces*, *Neurospora*, Hefe) sowie an Säugetierorganen ausgeführt wurden (Literatur siehe RAJALAKSHMI et al. 1970; ELLIS a. MAC DONALD 1970), wobei mögliche Permeationsänderungen nicht bzw. in anderer Weise auftreten könnten. Nun beweisen die Arbeiten von ELLIS a. MAC DONALD (1969, 1970) zusätzlich, daß CH selbst innerhalb höherer Pflanzen in verschiedenen Geweben unterschiedlich wirken kann: Sie finden für Blattgewebestückchen (Tabak, Kohl, Wasserlinse) keine direkten Hemmeffekte auf die ^{14}C -Leucin-Aufnahme, sondern nur eine Verzögerung von $1\frac{1}{2}$ — $1\frac{1}{2}$ Std., während im nichtgrünen Gewebe Hemmung eintritt.

Einige Autoren konnten auch fördernde Effekte von CH messen. DONDORF a. GRUENBERGER (1967) berichten, daß nach Vorbehandlung mit CH der Aminosäureeinbau ins Protein von Leberzellen stimuliert war, allerdings nur im in-vitro-System. SCHWOCHAU, LEE a. HADWIGER (1969) konnten mit CH niedriger Konzentration den ^{14}C -Leucin-Einbau ins Protein fördern. Daneben wurde auch die Sauerstoffaufnahme bei einigen Geweben durch CH erhöht (siehe ROMANI a. YU 1968; MAC DONALD a. ELLIS 1969). Außerdem konnte GALLING (1971) nachweisen, daß CH den Einbau von Uridin in die Vorstufen von Chloroplastenribosomen stimuliert. Es ist also, um mit ELLIS a. MAC DONALD zu sprechen, etwas voreilig, CH bei Geweben höherer Pflanzen als allgemeinen Hemmstoff der Proteinsynthese zu bezeichnen, denn CH „könnte den zellulären Stoffwechsel auch auf anderen Wegen als über Hemmung der Proteinsynthese beeinflussen“. Es sei nochmals herausgestellt, daß wir unsere Ergebnisse an grünem Blattgewebe erzielten, und zwar bei Konzentrationen, die optimal Blütenbildung induzieren, die also am Blüheffekt und nicht an der optimalen Stoffwechseländerung bzw. -beeinträchtigung orientiert waren.

Für die in der vorliegenden Arbeit gefundenen CH-Effekte sind mehrere Interpretationsrichtungen denkbar. Die Ergebnisse sprechen da-

für, daß der Antimetabolit über das Transportsystem der Zelle hemmend auf die Aufnahme organischer Stoffe wirkt, — vielleicht durch Hemmung der energieabhängigen Induktion einer Permease, wie sie TANNER u. KANDLER (1967) für die Glukoseaufnahme bei *Chlorella* postulierten; auch MATSUKA a. HASE (1969) erhielten bei *Chlorella* unter CH-Wirkung eine Hemmung der Glukoseaufnahme, wobei zusätzlich noch die Assimilation von Glukose in Lipide unterbunden wurde. Ergänzend dazu berichtet GALLING (1971) über Aufnahmehemmung von Phosphat durch CH, ebenfalls bei *Chlorella*.

Nun könnten unsere Versuche mit einer Vorinkubation von CH (wobei der ^{14}C -Einbau ins Protein gehemmt wird) aber auch dadurch erklärt werden, daß unter CH die Neusynthese aller Enzyme blockiert oder vermindert wird, während bei den schon vorhandenen die Aktivitätsdauer durch CH verlängert wird oder aber diese Enzyme durch Aktivierung (z. B. durch Konformationsänderung) die Syntheseleistung erhöhen. Sieht man dazu die Befunde von KENNEY (1967) sowie von FELDMAN a. YAGIL (1969), daß CH niedriger Konzentrationen die Halbwertszeit von Enzymen verlängern kann, so könnte unter CH die Synthese spezifischer Proteine bis zu einem gewissen Maße gefördert werden (— damit würde der noch weiterlaufende ^{14}C -Einbau an isolierten Blättern verständlich). Daß wir bei der Auftrennung der löslichen Proteine mittels Gelfiltration (Abb. 32) eine erhöhte Markierung bestimmter Proteine nachweisen konnten, hebt die eben geäußerten Gedanken über reine Spekulationen hinaus. Nun haben die Versuche mit fraktionierter Zentrifugation außerdem gezeigt (Tab. 16), daß vor allem ribosomale bzw. ribosomal gebundene, bei 50 000 x g nicht abzentrifugierbare Proteine unter CH-Wirkung stärker ^{14}C -markiert wurden als bei den Kontrollen, d. h. z. B. daß die unter CH-Einfluß entstehenden Proteine weniger gut von den Ribosomeneinheiten abgelöst werden könnten — vergleichbar den Ergebnissen von RAJALAKSHMI, FARBER et al. 1971. Eine andere z. T. ergänzende Erklärungsmöglichkeit eröffnen die Ergebnisse von MARTIN a. THIMANN (1970), bei denen CH in gleicher Weise wie Cytokinine die Chlorophyllausbleichung verhindert. Dem CH — wie auch einigen anderen Hemmstoffen der Proteinsynthese (Lit. siehe ZENK 1970) — käme hierbei die Bedeutung zu, die Alterung des Blattes zurückzudrängen bzw. zu verhindern, indem es die Synthese abbauender Enzyme (Proteasen, Hydrolasen)

hemmt und damit den Proteinabbau unterbindet. Dadurch könnten sowohl Proteingehalt als auch dessen spezifische Aktivität im Blatt ansteigen, was bei unseren CH-Versuchen zu beobachten war.

Daß die Induktion der Blütenbildung durch CH und 2-TU auf einer allgemeinen Hemmwirkung von Antimetaboliten im Stoffwechsel des Blattes beruht, ist deshalb unwahrscheinlich, weil andere Inhibitoren wie Puromycin und CAP sowie von anderen Autoren getestete Substanzen wie 5-FU, 5-BU usw. (Literatur bei EICHHOFF u. RAU 1969) keine blühinduzierende Wirkung auf das Blatt ausüben und im Fall von CAP sogar ohne Einfluß auf die photoperiodisch ausgelöste Induktion ist (Tab. 12). Für die Beantwortung der Frage, warum CH und 2-TU Blütenbildung auslösen, CAP, Puromycin und andere Antimetabolite dagegen nicht, liefern die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit keine Anhaltspunkte. Ein unterschiedlicher Angriff an den verschiedenen Ribosomen-Typen (70 S bzw. 80 S) als Ursache ist schon deshalb unwahrscheinlich, weil z. B. Puromycin und 2-TU die Proteinsynthese beider Typen beeinträchtigen sollen. Interessant ist jedoch in diesem Zusammenhang ein Vergleich der Strukturformeln der beiden induzierenden Antimetabolite CH und 2-TU (Abb. 33), die gewisse Analogien aufweisen; allerdings zeigen auch Uracil und die beiden Thymidinanaloga 5-FU und 5-BU, die zwar ebenfalls, aber in entgegengesetzter Weise, die Blütenbildung beeinflussen, eine ähnliche Konfiguration, wobei allerdings eine anders gelagerte Verteilung der Elektronen im Ring die Wirkung entscheidend verändern könnte*).

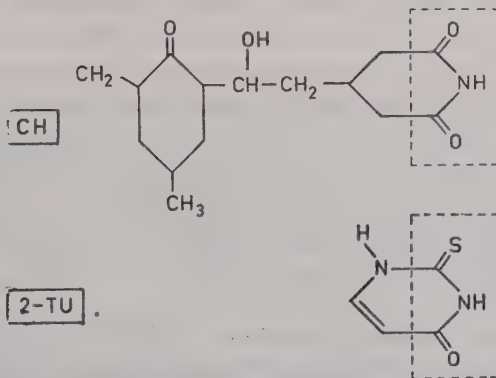


Abb. 33: Strukturformeln von Cycloheximid und 2-Thiouracil.

*) Anm.: 5-FU verhält sich funktionell weitgehend wie Uracil, 5-BU dagegen wie Thymin.

Vergleicht man nun unsere mit CH und 2-TU erzielten Ergebnisse mit den Angaben der Literatur, so kann herausgestellt werden, daß durch diese beiden induzierenden Antimetabolite wohl in erster Linie nicht die Proteinsynthese selbst, sondern vielmehr das Aufnahmesystem der Zelle geschädigt wird. Diese Aussage stützt sich auch auf die von einigen Autoren beobachtete Permeabilitätsänderung der Membran durch CH-Einfluß; so meinen WALLACE et al. (1970) sogar, daß CH die Zellmembranen zerstören könnte. Ergänzend dazu zeigen die Abbildungen der Autoradiographien (Abb. 14), daß unter CH die aufgenommene ^{14}C -Leucin-Menge im Blattgewebe stärker als bei den Kontrollen verteilt war. Außerdem könnte über Membranzerstörungen oder -änderungen die Abnahme des ^{14}C -Leucin-Einbaus ins Protein nach CH-Vorinkubation erklärbar werden. Im Zusammenhang mit der photoperiodischen Induktion wird für die Phytochromwirkung eine vergleichbare Permeabilitätsänderung der Membran als physiologische Erstreaktion diskutiert (TANADA 1968, JAFFE 1968, KANDELER 1970 und SHERWWOOD, EVANS u. ROSS 1971). Da nun unter steigenden induktiven Photoperioden ebenso wie unter CH und 2-TU bei ^{14}C -Gabe zu verschiedenen Zeiten nach Behandlungsbeginn der ^{14}C -Einbau ins Protein abnimmt, so könnte diese gleichartige Wirkung auf ähnliche Mechanismen hindeuten. Allerdings scheinen die in Abschnitt I/1 dargestellten Störlichtversuche nicht so recht in dieses Konzept zu passen, weil $1\frac{1}{2}$ stündiges HR-Störlicht die Blütenbildung bei H. n. nicht auslösen kann, gleich dauerndes weißes Störlicht jedoch schwach induktiv wirkt. Dies könnte darauf hindeuten, daß neben der reinen Phytochrom-gesteuerten Reaktion noch ein zweiter lichtgesteuerter Prozeß beteiligt ist. Zu denken wäre dabei an die bei hohen Lichtintensitäten auftretenden Phänomene der Hochenergiereaktion, von der BORTHWICK, HENDRICKS et al. (1969) vermuten, daß sie „das P_{DR} während des Tages hemmen und für die Nacht vergiften könnte“. EVANS (1971) nimmt dagegen für die Induktion der Blütenbildung zwei getrennte photoperiodische Prozesse an, wovon der eine durch hohe, der andere durch niedrige P_{DR} -Niveaus begünstigt wird.

Bedeutsam sind in diesem Zusammenhang die Ergebnisse, die das Zusammenwirken von Photoinduktion und „Chemo“-Induktion betreffen. Unsere Befunde ergaben eindeutig, daß CH und Licht im Blatt additiv wirken, und zwar auch dann, wenn die photoperiodische Induk-

tion unterschwellig ist (siehe Tab. 6); so bieten sich induktiv wirkende Antimetabolite als Mittel an, um unterschwellige Photoperioden mittels einer Blütrate erfassen und somit genauere Kenntnis über photoperiodische Reaktionsabläufe gewinnen zu können. Die additive Wirkung von LT und CH-Infiltration zeigt erstmals eindeutig, daß Prozesse, die zur Synthese von hypothetischem „Blühhormon“ führen, nicht erst dann anlaufen, wenn ein „photoperiodischer Schwellenwert“ (wie z. B. bei *Xanthium* angenommen) überschritten wird, sondern daß bereits eine unterschwellige photoperiodische Behandlung zu einer „Blühhormon“-Bildung führt, die allerdings offenbar nicht ausreicht, um den Vegetationspunkt umzustimmen. Während 2-TU und Licht ebenfalls additiv blühinduzierend wirken (EICHHOFF u. RAU 1969), erreichten wir mit CH plus 2-TU keine Addition der Effekte: Die Blütrate lag nur leicht über den für jede Bedingung charakteristischen Werten. Das spricht wahrscheinlich für einen gleichen Angriffsbereich oder aber dafür, daß wohl Addition stattfindet, aber nicht nur im Bereich der Induktion, sondern auch bei der schon diskutierten Hemmwirkung der Antimetabolite am Vegetationspunkt durch abtransportierte freie Inhibitoren, wodurch auch die leicht veränderte Blütrate bei simultaner Infiltration verständlicher würde (siehe Tab. 7).

Wie lassen sich aber nun die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den zur Zeit zur Diskussion stehenden Hypothesen zur Induktion der Blütenbildung vereinbaren? Wir können dabei grundsätzlich zwischen zwei Hauptrichtungen unterscheiden, die durch die Annahme einer „passiven“ bzw. „aktiven“ Auslösung der Blütenbildung charakterisiert sind.

Beim „passiven Prinzip“ wird davon ausgegangen, daß eine photoperiodisch induzierbare Pflanze nach Erreichen einer bestimmten Entwicklungsphase von Natur aus blühen könnte, wenn nicht ein in den Blättern während nichtinduktiver Bedingungen gebildeter und zum Vegetationspunkt transportierter Hemmstoff die Ausbildung von Blütenanlagen verhindern würde (vergl. Blühhemmstofftheorie nach DENFFER, siehe auch Einleitung).

Auf den ersten Blick scheint die Hypothese unter der Annahme, daß CH und 2-TU sowie induktive Photoperioden die Synthese eines solchen „Blühhemmstoffes“ verhindern können, mit unseren Ergebnissen

an H. n. in Einklang zu stehen. So könnte etwa aus dem Befund, daß die ^{14}C -Aufnahme und damit wahrscheinlich der gesamte (energieabhängige) Transport durch CH und 2-TU im Blatt gehemmt wird, geschlossen werden, daß dieser Hemmstoff nicht mehr zum Vegetationspunkt gelangen kann. Falls dagegen CH und 2-TU die Proteinneusynthese hemmen würden, so könnte – unter der Annahme, daß dieser Hemmstoff ein Protein ist – dessen Synthese nicht stattfinden. Bei Photoinduktion müßte dann die Bildung des vermeintlichen proteinanteiligen Blühhemmstoffes ebenfalls unterbleiben z. B. durch Genrepression; Ansatzpunkte dafür liefern Arbeiten, in denen für die Steuerung der Genaktivität bei bestimmten Prozessen das Phytochrom verantwortlich gemacht wird (Literatur siehe MOHR 1970). Schwerwiegende Argumente gegen die Blühhemmstoffhypothese liefern jedoch Pfropfversuche (Lit. LANG 1965), die klar beweisen, daß aus den Blättern ein aktiv blühinduzierendes Agens zum Vegetationskegel transportiert werden muß, um Blütenbildung auslösen zu können. Zwar scheinen die Ergebnisse von LANG u. MELCHERS (1941), daß H. n. bei ständiger Entblätterung im KT Blütenanlagen ausbildet, die Blühhemmstoffhypothese zu stützen, aber die im Dauerdunkel bei verschiedenen LTP erzielten Blüherfolge anderer Autoren sprechen wiederum dagegen (Literatur siehe INOUE a. ITO 1968). Nun sind auch die Befunde unserer Versuche bei CH-Infiltration eines Teils der Blätter (Tab. 10) nicht mit dieser Hypothese zu vereinbaren; die Blühraten liegen dabei nämlich letzten Endes genauso hoch, bei stärkeren CH-Konzentrationen (10^{-4} m) sogar höher als die Werte bei vollständiger CH-Infiltration. Ein eventueller Blühhemmstoff der nichtinduzierten Blätter hätte aber den Blüherfolg auf jeden Fall verhindern, mindestens aber drastisch herabsetzen müssen.

Nach den bisher angeführten Daten scheint bei der Blütenbildung somit alles für ein „aktives Prinzip“ zu sprechen, dh. daß im Blatt unter induktiven Bedingungen ein Blühstimulus gebildet und zum Vegetationspunkt transportiert wird, wo er Blütenbildung auslöst (Lit. siehe Lang 1965). Allerdings ist die Bildung dieses Blühstimulus selbst noch umstritten. Nach WELLENSIEK et al. (1959, 1970) wird unter nicht induktiven Bedingungen ein Hemmstoff gebildet, der die Synthese eines Blühstimulus blockiert; bei Induktion würde nun die Produktion dieses Hemmstoffes unterbunden. Nach GIBBY a. SALISBURY (1971) wird

jedoch im Blatt stets, je nach Bedingung, entweder ein Blühstimulus, das „Florigen“ oder ein nicht näher definierter Hemmstoff der Blütenbildung synthetisiert.

Diese Annahmen treffen für unsere Befunde nur dann zu, wenn dieser Hemmstoff des Blühstimulus sowohl unter CH, 2-TU als auch induktiven Photoperioden nicht synthetisiert wird. Wäre das zum Vegetationspunkt transportierte „Florigen“ eine m-RNS (HESS 1971 nimmt eine labile m-RNS an), so würde verständlich, wenn trotz des von uns festgestellten wahrscheinlich allgemein gehemmten Transports nur geringe Mengen des Blühstimulus zur Realisation der Blütenbildung ausreichen. An der im Vegetationskegel nach UMEMURA a. OOTA (1965) stabilisierten m-RNS könnten dann nämlich durch wiederholte Translation die benötigten Enzyme synthetisiert werden (vergleiche auch ZEEVAART 1958, 1962 in LANG 1965).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedenfalls eindeutig, daß durch CH und 2-TU induzierender Konzentrationen die Proteinsynthese nicht allgemein gehemmt wird, sondern daß im Gegenteil bei Induktionsvorgängen neue Proteinfractionen auftreten. Die Trennung der löslichen Blattproteine an der Sephadexsäule G 200 ergab nämlich, daß unter blühinduzierenden Bedingungen bestimmte hochmolekulare oder ribosomal gebundene Proteine vermehrt mit ^{14}C -Leucin markiert und somit auch synthetisiert wurden (vergl. Abb. 31). In der Literatur gibt es vergleichbare Angaben zum gleichen Induktionsvorgang. OOTA a. UMEMURA sowie BERNIER (weitere Literatur siehe BERNIER 1970) fanden nach photoperiodischer Induktion in den Cotyledonen von *Pharbitis nil* zusätzliche Proteine. EVANS (1971) stellt jedoch in einem zusammenfassenden Bericht heraus, daß bei KTP die RNS-Synthese in den Blättern kein notwendiges Bestandteil der Induktion sei, weil er zusammen mit SHERWOOD a. ROSS (1971) mittels Doppelmarkierung keine Änderung im Proteinmuster von induzierten *Xanthium*-Pflanzen (KTP) findet. Dieser Befund ist vielleicht auf die sehr kurzen Einbauzeiten der gefütterten radioaktiven Aminosäuren zurückzuführen; unsere Kinetiken haben nämlich ergeben, daß sich erst nach längeren Zeitabschnitten bei H. n. deutliche qualitative Unterschiede im Proteinmuster induzierter Blätter ergeben. Versuche von HODSON a. HAMNER (1970), die im Biotest mit Acetonextrakt aus blühenden Pflanzen bei vegetativen Exemplaren generative Organe

induzieren konnten, deuten jedenfalls auch darauf hin, daß im Blatt aktive Stoffe – der Extraktion nach vermutlich Proteine – an der Blütenbildung beteiligt sind.

Abschließend kann demnach gesagt werden, daß unsere Ergebnisse und auch die meisten Daten aus der Literatur dafür sprechen, daß bei der Induktion der Blütenbildung im Blatt ein Blühstimulus gebildet wird, an dessen Synthese nicht nur der RNS-Stoffwechsel, sondern auch der Proteinstoffwechsel entscheidend beteiligt ist.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. An der qualitativen Langtagpflanze *Hyoscyamus niger* wurde durch selektive Applikation auf Blätter und Vegetationspunkt die Wirkung verschiedener Antimetabolite der Proteinsynthese – vor allem von Cycloheximid (CH) – sowie verschiedener Photoperioden auf die Blütenbildung geprüft. Unter den gleichen Bedingungen wurde als Maß für die Intensität der Proteinsynthese der Einbau von radioaktiv markiertem L-Leucin in die löslichen Blattproteine untersucht. Damit sollte ein Beitrag zur Lösung der Frage geliefert werden, inwiefern der Proteinstoffwechsel des Blattes an der Induktion der Blütenbildung beteiligt ist.

2. Zur Untersuchung der Blütenbildung wurden die Pflanzen so präpariert, daß von der gesamten Rosette nur die äußeren 3–6 ausgewachsenen Blätter sowie die innersten 8–10 Blattprimordien stehen blieben. Anschließend erfolgte dann die photoperiodische Behandlung der Pflanzen oder/und Applikation der in Wasser gelösten Antimetabolite: Die ausgewachsenen Blätter wurden mittels Vakuuminfiltration mit den entsprechenden Substanzen inkubiert, dem Vegetationskegel wurden die wäßrigen Lösungen entweder mittels eines konischen Röhrchens oder eines Wattepfropfens appliziert. Die Blütenanlagen und der Blattzuwachs konnten nach fünf bis sechs Wochen mit dem Binokular festgestellt werden.

3. Applikation von CH auf den Vegetationskegel hemmte die Blütenbildung, eine Infiltration in die äußeren ausgewachsenen Blätter löste dagegen bei bestimmten Konzentrationen (um $2 \cdot 10^{-5}$ m CH) bis zu maximal 60 % Blütenbildung aus; die nicht zu erreichende 100%ige Induktion ist möglicherweise auf den Abtransport von CH aus den Blättern zum Vegetationspunkt zurückzuführen.

Andere Antimetabolite, wie CAP und Puromycin, vermögen auf diese Weise keine Blütenbildung auszulösen.

4. Addition verschiedener induktiver Bedingungen.

a) Es konnte nachgewiesen werden, daß Infiltration von CH in die Blätter und induktive Photoperioden auf die Blütenbildung additiv wirken. Beide addieren sich auch dann, wenn die Photoinduktion unterhalb des Schwellenwertes liegt; dadurch können die für sich allein unwirksamen Induktionsstöße als Blühsraten erfaßt werden. Damit wurde erstmals eine Methode gefunden, um unterschwellige photoperiodische Induktionen ohne „Abkling“-Phänomene nachweisen zu können.

b) Die Kombination einer Infiltration von CH und 2-Thiouracil (2-TU, einem anderen gleichartig wie CH auf die Blütenbildung wirkenden Antimetaboliten) ergab keine vollständige Addition der Blüheffekte.

5. Bei CH-Infiltration eines Teils der Blätter wird zwar durch die nicht-behandelten Blätter die Blühsrate herabgedrückt; erhöht man jedoch die CH-Konzentration, so wird der bei „Chemo“-Induktion aller Blätter erzielte Maximalwert ebenfalls erreicht. Dieses Ergebnis spricht neben anderen gegen die „Hemmstoff“-Hypothese von DENFFER als Erklärungsmöglichkeit für die Induktion der Blütenbildung.

6. Unter CH, wie auch unter 2-TU und bei photoperiodisch induktiven Bedingungen, ist die Atmung des Blattgewebes von *H. n.* um 65–80 % erhöht, wobei der RQ durchweg bei eins liegt. Die Wirkung von CH auf die Atmung konnte an photoperiodisch nicht aktiven Pflanzen von *Phaseolus multiflorus* bestätigt werden. Das Antibiotikum CAP fördert die Atmung dagegen praktisch nicht. Es wird vermutet, daß Blüteninduktion und zunehmende Atmungssteigerung bei *H. n.* korreliert sind.

7. Zur Bestimmung der Proteinsynthese wurden Blätter von *H. n.* mit den verschiedenen Antimetaboliten infiltriert bzw. verschiedenen photoperiodischen Bedingungen ausgesetzt und der Einbau von über den Stengel gefüttertem ^{14}C -Leucin in die löslichen Proteine des Blattes gemessen.

a) „Induktive“ Antimetabolite, nämlich CH und 2-TU, stimulieren bei entsprechenden Konzentrationen den ^{14}C -Einbau in die löslichen Proteine, wenn sie zusammen mit dem ^{14}C -Leucinpuls gegeben werden; sie erhöhen auch den Gehalt an löslichem Protein. Erfolgt jedoch Vorinkubation mit den Antimetaboliten, so wird der Einbau der mar-

kierten Aminosäure in die löslichen Proteine stark gehemmt; dieser Effekt setzt jedoch erst einige Stunden nach Infiltration der Antimetabolite ein. Es werden sowohl eine Hemmung der Proteinsynthese, speziell eine Hemmung der Synthese abbauender Enzyme als auch Transporthemmung z. B. durch Änderung der Permeabilität der Membranen als Ursache für die Wirkungsweise induktiver Antimetabolite, insbesondere von CH, diskutiert.

b) Bei photoperiodischer Induktion wird der ^{14}C -Einbau in die löslichen Proteine bei ^{14}C -Gabe zu Beginn der Photoperiode stark erhöht, bei ^{14}C -Gabe zu verschiedenen Zeiten nach Beginn der Photoperiode jedoch erniedrigt; die Ergebnisse gleichen den mit induktiven Antimetaboliten erzielten Werten.

c) CAP hat auf die Proteinsynthese, ebenso wie auf die Blütenbildung und Atmung, praktisch keine Wirkung.

d) Hohe CH-Konzentrationen (über 10^{-4} m) hemmen Blütenbildung und ^{14}C -Einbau ins lösliche Protein; dabei sind die Blätter nach kurzer Zeit stark geschädigt.

8. Die Fraktionierung der löslichen Proteine von induzierten Blättern (Cycloheximid, Dauerlicht) durch Gelfiltration mit Sephadex G 200 ergab, daß während der Induktion bestimmte hochmolekulare bzw. ribosomal gebundene Proteine spezifisch stärker radioaktiv markiert werden. Daraus kann geschlossen werden, daß bei der Induktion der Blütenbildung im Blatt bestimmte Proteine neu synthetisiert werden.

9. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden mit einigen aktuellen Hypothesen zur Blütenbildung verglichen und mögliche Schlußfolgerungen diskutiert.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- ANDREWS, P.: The Gel-Filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. Journ.* 96, 595–606 (1965).
- BAILEY, J. L. *Techniques in protein chemistry*. Elsevier (1962).
- BALIGA, B. S., S. A. COHEN a. H. N. MUNRO: Effect of Cycloheximide on the reaction of Puromycin with polysome-bound peptidyl-t-RNA. *FEBS Letters* 8, 249–252 (1970).
- BALIGA, B. S., A. W. PRONCZUK a. H. N. MUNRO: Mechanism of Cycloheximide inhibition of protein synthesis in a cell-free system prepared from Rat liver. *Journ. Biol. Chem.* 244, 4480–4489 (1969).
- BARBAT, J. a. C. OCHESANU: The nature of the photoperiodical induction. The presence of a flowering-hormon or a flowering-inhibitor. *Naturwiss.* 52, 458 (1965).
- BERNIER, G.: *Cellular and Molekular Aspects of Floral Induction*. London (1970).
- BEUTH, E.: Über die Wirkung von Dinitrophenol und Azid auf die Blütenbildung von *Hyoscyamus niger*. Zulassungsarbeit, München (1964).
- BILLER, E. CH. u. W. RAU: Über die Wirkung verschiedener Inhibitoren auf den Atmungsverlauf von Blattgeweben. Zulassungsarbeit, Universität München (1962).
- BILLINGTON a. HEYES: Effects of inhibitors on lightstimulated synthesis in Radish hypocotyl. *Nature* 227, 858–860 (1970).
- BISWAS, P. K., K. B. PAULA a. J. H. M. HENDERSON: Effect of Chrysanthemum plant extract on flower initiation in short-day plants. *Physiol. Plant.* 19, 875–882 (1966).
- BLOBEL, G. a. D. SABATIM: Dissociation of mammalian polyribosomes into subunits by Puromycin. *Proc. Nat. Academ. of Sci.* 68, 390–394 (1971).
- BONNER, J. a. J. A. D. ZEEVAART: Ribonucleic acid synthesis in the bud, an essential component of floral induction in *Xanthium*. *Plant Physiol.* 37, 43–49 (1962).
- BORTHWICK, H. A. a. S. B. HENDRICKS: Photoperiodism. In: *Handbuch der Pflanzenphysiologie* XVI, 312–316 (1961).
- BORTHWICK, H. A., S. B. HENDRICKS a. M. W. PARKER: The reaction controlling floral initiation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 38, 929–934 (1952).
- BORTHWICK, H. A., S. B. HENDRICKS, M. J. SCHNEIDER, R. B. TAYLORSON a. V. K. TOOLE: The high-energie light action controlling plant response and development. *Proc. Nat. Acad. of Sci. USA* 64, 479–486 (1969).
- BRONCHART, R., G. BERNIER, J.-M. KINET a. A. HAVELANGE: RNA-synthesis in the cells of the apical meristem of *Sinapis alba* during transition from the vegetative to the reproductive condition. *Planta* 91, 255–269 (1970).

- BROWN, J. A. M.: Effect of thymidine analogues on reproductive morphogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Nature* 196, 51–53 (1962).
- BÜCHER, M. a. H. SIES, in: *Inhibitors-Tools in cell research*. Springer-Verlag Berlin (1969).
- BÜNNING, E.: *Die physiologische Uhr*. Springer-Verlag (1963).
- CHAILAKHYAN, M. K.: Internal factors of plant flowering. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 19, 1–36 (1968).
- CLAES, H.: Die Beteiligung des dissimilatorischen Stoffwechsels an der photoperiodischen Reaktion von *Hyoscyamus niger*. *Z. Naturforschg.* 2 b, 45–55 (1947).
- CLAUSS, H. u. W. RAU: Über die Blütenbildung von *Hyoscyamus niger* und *Arabidopsis thaliana* in 72-Stunden-Zyklen. *Z. Bot.* 44, 437–454 (1956).
- CLELAND, C. J. a. J. A. D. ZEEVAART: Gibberellins in relation to flowering and stem elongation in the long-day plant *Silene armeria*. *Plant Physiol.* 46, 392–400 (1970).
- CLELAND, CH. F. a. W. S. BRIGGS: Gibberellin and CCC-Effects on flowering and growth in the long-day plant *Lemna gibba* G 3. *Plant Physiol.* 44, 503–507 (1969).
- COLLINS, W. T. a. F. B. SALISBURY: Antimetabolites and flowering of *Cocklebur*. *Plant Physiol.* 37, 43–49 (1962).
- COLLINS, W. T., F. B. SALISBURY a. C. W. ROSS: Growth regulators and flowering. III. Antimetabolites. *Planta* 60, 131–144 (1963).
- v. DENFFER, D.: Blühhormon oder Blühhemmung? Neue Gesichtspunkte zur Physiologie der Blütenbildung. *Naturwiss.* 37, 297–301, 317–321 (1950).
- DONDORF, W. R. a. D. GRUENBERGER: Comparison of Cycloheximide effect on hepatic protein synthesis at the microsomal level in vivo and in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 16, 2055–2059 (1967).
- DOWNS, R. J.: Photoreversibility of flower initiation. *Plant Physiol.* 31, 279 bis 284 (1956).
- EICHHOFF, E.: Untersuchungen zur Induktion der Blütenbildung bei der Langtagpflanze *Hyoscyamus niger* im Kurztag durch 2-Thiouracil. Dissertation, Universität München (1969).
- EICHHOFF, E. u. W. RAU: Auslösung der Blütenbildung bei der Langtagpflanze *Hyoscyamus niger* im Kurztag durch 2-Thiouracil. *Planta* (Berl.) 87, 290–303 (1969).
- ELLIS, R. J. a. I. R. MAC DONALD: Specificity of Cycloheximide in higher plant systems. *Plant Physiol.* 46, 227–232 (1970).
- ENGELSMA G.: The influence of light of different spectral regions on the synthesis of phenolic compounds in Gherkin seedlings, in relation to photomorphogenesis. IV. Mechanism of far-red action. *Acta Bot. Neerl.* 17 (2), 85–89 (1968).
- EVANS, L. T.: Inflorescence initiation in *Lolium temulentum* L. II. Evidence for inhibitory and promotive photoperiodic processes involving transmissible products. *Aust. J. Biol. Sci.* 13, 429–440 (1960).

- EVANS, L. T.: Inflorescence initiation in *Lolium temulentum* L. III. The effect of anaerobic conditions during photoperiodic induction. *Aust. J. Biol. Sci.* 15, 281–290 (1962).
- EVANS, L. T.: Inflorescence initiation in *Lolium temulentum* L. VI. Effects of some inhibitors of nucleic acid, protein, and steroid biosynthesis. *Aust. J. Biol. Sci.* 17, 24–35 (1964).
- EVANS, L. T.: Flower Induction and the Florigen Concept. *Annual Rev. of Plant Physiol.* 22, 365–394 (1971).
- FEIERABEND, J. u. R. BÜNSOW: Fördernder Einfluß von Chloramphenicol auf die Vernalisation von Winterroggen. *Flora Abt. A* 158, 153–156 (1967).
- FELDMAN, M. a. G. YAGIL: Does Cycloheximide interfere with protein degradation. *Biochem. a. Biophys. Res. Comm.* 37, 198–203 (1969).
- FRIEND, D. J. C.: Spectral requirements for flower initiation in two long-day plants, Rape (*Brassica campestris*) and Spring Wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol. Plant.* 21, 1185–1195 (1968).
- GALLING, G.: Der Einfluß von Rifamycin, Chloramphenicol und Cycloheximid auf den Uridin-Einbau in chloroplastidare Ribosomenvorstufen von *Chlorella*. *Planta (Berl.)* 98, 50–62 (1971).
- GARNER, W. W. a. H. A. ALLARD: The effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *J. Agr. Res.* 18, 552–607 (1920).
- GIBBY, D. D. a. F. B. SALISBURY: Participation of long-day inhibition in flowering of *Xanthium strumarium* L. *Plant Physiol.* 47, 784–789 (1971).
- GOREN, R. a. S. P. MONSELISE: Promotion of flower formation and fruit set in *Citrus* by Antimetabolites of nucleic-acid and protein synthesis. *Planta* 88, 364–368 (1969).
- GRILL, R. a. D. VINCE: Photocontrol of anthocyanin formation in Turnip-seedlings. III. The photoreceptors involved in the responses to prolonged irradiation. *Planta* 70, 1–12 (1966).
- DE GROOT, N., A. PANET a. Y. LAPIDOT: Reaction of Puromycin with chemically prepared petidyl-transfer-RNA. *Europ. J. Biochem.* 15, 215–221 (1970).
- GUILLOT, A.: Action de la 2-thiouracile sur la rhizogenese dans les boutures de plantules etiolées de tomate. *Planta* 67, 96–102 (1965).
- GULICH, L.: Veränderungen in der Nucleinsäure-Fraktion grüner Blätter im Zusammenhang mit photoperiodischer Induktion. *Planta* 54, 374–393 (1960).
- HANSON, J. B. a. T. K. HODGES: Uncoupling action of Chloramphenicol as a basis for the inhibition of ion accumulation. *Nature* 200, 1009 (1963).
- HARTMANN, G., W. BEHR, K.-A. BEISSNER, K. HONIKEL u. A. SIPPEL: Antibiotika als Hemmstoffe der Nucleinsäure- und Proteinsynthese. *Angew. Chemie* 80, 710–718 (1968).

- HARTMANN, K. M.: A general hypothesis to interpret "high energy phenomena" of photomorphogenesis on the basis of phytochrome. *Photochem. a. Photobiol.* 5, 349—366 (1966).
- HEIDE, O. W.: Interaction of growth retardants and temperature in growth, flowering, regeneration and Auxin activity of *Begonia heimanthia* Everett. *Physiol. Plantarum* 22, 1001—1012 (1969).
- HENDRICKS, S. B., H. A. BORTHWICK a. R. J. DOWNS: Pigment conversion in the formative response of plants to radiation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 42, 19—26 (1956).
- HESLOP-HARRISON, J.: Suppressive effects of 2-thiouracil on differentiation and flowering in *Cannabis sativa*. *Science* 132, 1943—1944 (1960).
- HESLOP-HARRISON, J.: Effect of 2-thiouracil in cell differentiation and leaf morphogenesis in *Cannabis sativa*. *Ann. Bot.* 26, 375—387 (1962).
- HESS, D.: Die selektive Blockierung eines an der Blühinduktion beteiligten Ribosenucleinsäure-Eiweißsystems durch 2-Thiouracil (untersucht an *Streptocarpus wendlandii*). *Planta* 54, 74—95 (1959).
- HESS, D.: Molekulare Genetik bei höheren Pflanzen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 83, 279—300 (1970).
- HEYES, J. K. a. D. VAUGHAN: The effects of 2-thiouracil on growth and metabolism in the root. *Proc. Roy. Soc. B* 169, 89—105 (1967).
- HIRONO, Y. a. G. P. REDEI: Acceleration of flowering of the long-day plant *Arabidopsis* by 8-azaguanine. *Planta* 68, 88—93 (1966).
- HIRONO, Y. a. G. P. REDEI: Early flowering in *Arabidopsis* induced by DNA-base analogs. *Planta* 71, 107—112 (1966).
- HODSON, H. K. a. K. C. HAMNER: Floral inducing extracts from *Xanthium*. *Science* 167, 384—385 (1970).
- INOUE, J. a. K. ITO: Flower initiation in total darkness in long-day plant, *Hordeum vulgare* L. *Plant a. Cell Physiol.* 9, 137—142 (1968).
- JAFFE, M. J.: Phytochrome-mediated bioelectric potentials in Mung Bean seedlings. *Science* 162, 1016—1017 (1968).
- JOY, K. W. a. B. F. FOLKEBS: The uptake of aminoacids and their incorporation into the proteins of excised Barley embryos. *Journ. Exp. Bot.* 16, 646—666 (1965).
- JOUSTRA, M. K.: Flower initiation in *Hyoscyamus niger* L. as influenced by widely divergent daylengths in different light qualities. Wageningen (1970).
- KALBERER, F. u. J. RUTSCHMANN: Eine Schnellmethode zur Bestimmung von Tritium, Radiokohlenstoff und Radioschwefel in beliebigem organischem Probenmaterial mittels des Flüssigkeits-Scintillationszählers. *Helvetica Chim. Acta*, 1956—1966 (1961).

- KANDELER, R.: Förderung der Blütenbildung von *Lemna gibba* durch DCMU und ADP. Z. f. Pflanzenphysiol. 61, 20–28 (1969).
- KANDELER, R.: Die Wirkung von Lithium und ADP auf die Phytochromsteuerung der Blütenbildung. *Planta* (Berl.) 90, 203–207 (1970).
- KANG, B. G. a. P. M. RAY: Effects of inhibitors of RNA and protein synthesis on Bean hypocotyl hook opening and their implications regarding Phytochrome action. *Planta* 87, 217–226 (1968).
- KATAGIRI, H., Y. SUZUKI a. T. TOCHIKURA: Studies on the action of antibiotics on bacterial metabolism. V. On a site of the action of chloramphenicol. *Journ. of Antibiotics, Ser. A* Vol. XII/5 (1960).
- KENNEY, F. T.: Turnover of Rat liver Tyrosine Transaminase: Stabilization after Inhibition of Protein synthesis. *Science* 156, 525 (1967).
- KERRIDGE, D.: *Journ. Gen. Microbiol.* 19, 497 (1958), zitiert nach BALIGA, B. S., A. W. PRONCZUK a. H. N. MUNRO.
- KESSLER, B., R. BAK a. A. COHEN: Flowering in fruit trees and annual plants as affected by purines, pyrimidines and triiodobenzoic acid. *Plant Physiol.* 34, 605–607 (1959).
- KHAN, A. A.: Inhibition of lettuce seed germination and seedling growth by antimetabolites of nucleic acids and reversal by nucleic acid precursors and gibberellic acid. *Planta* 68, 83–87 (1966).
- KHAN, A. A.: Dependence of gibberellic acid-induced dark germination of lettuce seed on RNA synthesis. *Planta* 72, 284–288 (1967).
- KLEIN, S., H. BARENHOLZ a. A. BUDNIK: The initiation of growth in isolated lima bean axes. Physiological and fine structural effects of Actinomycin D, Cycloheximide and Chloramphenicol. *Plant a. Cell Physiol.* 12, 41 bis 60 (1971).
- KNOTT, J. E.: Effect of a localized photoperiod on spinach. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 31; 152–154 (1934).
- KOLLI, S.: Chemical control of flowering. *The Botan. Rev.* 35, 195–200 (1969).
- KOWALLIK, W.: Über die Wirkung von Kaliumjodid auf die lichtstimulierte endogene Atmung von Algen. *Planta* 79, 122–127 (1968).
- KREKULE, J.: Actinomycin D effect on flowering in *Chenopodium rubrum* L. Z. f. Pflanzenphysiol. 64, 65–68 (1971).
- KUIJPER, J. a. L. K. WIERSUM: Occurrence and transport of a substance causing flowering in the Soya bean (*Glycine Max* L.). *Proc. Kon. Ak. Wetensch.* 39, 1–10 (1936).
- LANG, A.: Über die Bedeutung von Licht und Dunkelheit in der photoperiodischen Reaktion von Langtagpflanzen. *Biol. Zbl.* 61, 427–432 (1941).
- LANG, A.: Übertragung der Hemmwirkung der Blätter auf die Blütenbildung bei *Hyoscyamus niger* in Kurztagbedingungen durch Pfropfung. *Naturwiss.* 30, 590–591 (1942).
- LANG, A.: Gibberellin and flower formation. *Naturwiss.* 43; 544 (1956).

- LANG, A.: Physiology of flower initiation. In: Handbuch d. Pflanzenphysiologie XV/1, 1380—1536 (1965).
- LANG, A. u. G. MELCHERS: Über den hemmenden Einfluß der Blätter in der photoperiodischen Reaktion der Pflanze. Naturwiss. 29, 82—83 (1941).
- LANG, A. u. G. MELCHERS: Die photoperiodische Reaktion von *Hyoscyamus niger*. Planta 33, 653—702 (1943).
- LANG, A. u. G. MELCHERS: Auslösung von Blütenbildung bei Langtagpflanzen unter Kurztagbedingungen durch Aufpfropfung von Kurztagpflanzen. Z. Naturforsch. 3 b, 108—111 (1948).
- LANG, A. u. G. MELCHERS: Die photoperiodische Reaktion von *Hyoscyamus niger*. Planta 33, 653—702 (1943).
- LARSON, L. A. a. H. BEEVERS: Amino acid metabolism in young Pea seedlings. Plant Physiol. 40, 424—432 (1965).
- LEES, A. D.: Photoperiodic timing mechanism. Nature 210, 986 (1966).
- LINCOLN, R. G., D. L. MAYFIELD a. A. CUNNINGHAM: Preparation of a floral initiating extract from *Xanthium*. Science 133, 756 (1961).
- LOCKHART, J. a. K. HAMNER: Mechanism of the photoperiodic process in higher plants. Handbuch d. Pflanzenphysiol. 16, 390—438 (1961).
- VAN LOON, L. C. a. A. VAN KAMMEN: Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Sansum" and "Sansum NN"-I. Phytochem. 7, 1727—1737 (1968).
- MAC DONALD, J. a. R. J. ELLIS: Does Cycloheximide inhibit protein synthesis specifically in plant tissue? Nature 222, 791—792 (1969).
- MARGULIES, M. M. a. CH. BRUBAKER: Effect of Chloramphenicol on amino acid incorporation by chloroplasts and comparison with the effect of Chloramphenicol on chloroplast development in vivo. Plant Physiol. 45, 632—633 (1970).
- MARTIN, C. a. K. V. THIMANN: Promotion and inhibition of senescence in oat leaves. Plant Physiol. 46 / Suppl. 51 (1970).
- MARUSHIGE, K. a. Y. MARUSHIGE: Effects of 8-azaguanine, 2-thiouracil and ethionine on floral initiation and vegetative development in seedlings of *Pharbitis Nil* Chois. Bot. Mag. 75, 270—272 (1962).
- MATSUKA, M. a. E. HASE: Effect of Cycloheximide on the process of "glucose-bleaching" in *Chlorella protothecoides*. Plant a. Cell Physiol. 10, 277 bis 282 (1969).
- MEIJER, G.: The influence of light quality on the flowering response of *Salvia occidentalis*. Acta Bot. Neerl. 6, 395—406 (1957).
- MELCHERS, G.: Die Wirkung von Genen, tiefen Temperaturen und blühenden Pfropfpartnern auf die Blühreife von *Hyoscyamus niger*. Biol. Zbl. 57, 568 (1937).
- MELCHERS, G. u. H. CLAES: Auslösung von Blütenbildung bei der Langtagpflanze *Hyoscyamus niger* in Kurztagbedingungen durch Hemmung der Atmung in den Dunkelphasen. Naturwiss. 31, 249 (1943).

- MELCHERS, G. u. A. LANG: Weitere Untersuchungen zur Frage der Blüh-hormone. Biol. Zbl. 61, 16–39 (1941).
- MELCHERS, G. u. A. LANG: Auslösung von Blütenbildung bei der Langtag-pflanze *Hyoscyamus niger* in Kurztagbedingungen durch Infiltration der Blätter mit Zuckerlösungen. Naturwiss. 30, 589–590 (1942).
- MELCHERS, G. u. A. LANG: Versuche zur Auslösung von Blütenbildung an zweijährigen *Hyoscyamus-niger*-Pflanzen durch Verbindung mit ein-jährigen ohne Gewebeverwachsung. Z. f. Naturforsch. 3 b, 105–107 (1948).
- METZNER, H.: Veränderungen der Blattproteine bei photoperiodischer In-duktion. Planta 45, 493–534 (1955).
- MILLER, J. a. C. W. ROSS: Inhibition of leaf processes by p-fluorophenyl-alanine during induction of flowering in Cocklebur. Plant Physiol. 41, 1185–1192 (1966).
- MOHR, H.: Regulation der Enzymsynthese bei höheren Pflanzen. Naturw. Rundsch. 23, 187–195 (1970).
- MOHR, H. u. E. PINNIG: Der Einfluß des Lichtes auf die Bildung von Blatt-primordien am Vegetationspunkt der Keimlinge von *Sinapis alba* L. Planta (Berl.) 58, 569–579 (1962).
- MOHR, H. u. R. SENF: Die Hemmung der phytochrom-induzierten Anthocyan-synthese durch Puromycin und 2-Thiouracil. Planta 71, 195–203 (1966).
- MORRIS, J.: The effect of Cycloheximide (Actidione) on protein and nucleic acid synthesis by *Chlorella*. Jour. of Experim. Botany 18, 54–64 (1967).
- MOSKOV, B. S.: entnommen CHAILAKHYAN, M. KH., Ann. Rev. Plant Physiol. 19, 1–36 (1968).
- MUKHERJEE, J. a. D. J. CARR: Extraction of florigenic substances from *Xanthium*. Plant Physiol. Suppl. 42, S. 20 (1967).
- NAYLOR, A. W.: The photoperiodic control of plant behaviour. Handbuch d. Pflanzenphysiol. 16, 331–389 (1961).
- NEUPERT, W., W. SEBALD, A. J. SCHWAB, P. MASSINGER a. TH. BÜCHER: Incorporation in vivo of ^{14}C -labelled amino acids into the proteins of mitochondrial ribosomes from *Neurospora crassa* sensitiv to Cyclo-heximide and insensitiv to Chloramphenicol. FEBS 13, 589–591 (1969).
- OTA, Y.: RNA in developing plant cells. Ann. Rev. Plant Physiol. 15, 17–36 (1964).
- OTA, Y.: Frond and flower production in *Lemna gibba* G 3 in presence of respiratory inhibitors. Plant a. Cell Physiol. 10, 621–634 (1969).
- PADRON, J. L., S. C. SMITH a. H. RAMSEY: Chloramphenicol resistance in *Micrococcus pyrogenes*. Proc. sec. Exp. Biol. a. Med. 87, 477–478 (1954).
- PARKER, M. W., S. B. HENDRICKS a. H. A. BORTHWICK: Action spectrum for the photoperiodic control of floral initiation of the long-day plant *Hyoscyamus niger*. Bot. Gaz. 111, 242–252 (1949).

- PARKER, M. W., S. B. HENDRICKS, H. A. BORTHWICK a. N. J. SCULLY: Action spectrum for the photoperiodic control of floral initiation of short-day plants. *Bot. Gaz.* 108, 1–26 (1946).
- POLYA, G. M.: Inhibition of protein synthesis and cation uptake in Beetroot tissue by Cycloheximide and Cryptopleurine. *Aust. Jour. of Biol. Sci.* 21, 1107 (1968).
- POZSAR, B. a. I. BELA: Regulating influence of some potential pyrimidine base analogs on nucleic acid synthesis in Bean leaves. *Chemical Abstracts* 72/8, Nr. 77 688 z (1970).
- PSAREV, G. M.: Localization of photoperiodic stimulus in soybean (Russ.). *Sovietskaja Bot.* 3, 88–91 (1936).
- RAJALAKSHMI, S., H. LIANG, D. S. R. SARNA, R. KISILEVSKY a. E. FARBER: Cycloheximide, an inhibitor of peptide chain termination or release in liver in vivo and in vitro. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 42, 259 bis 265 (1971).
- RAU, W.: Über die Wirkung von einmaligen 2,4-DNP-Gaben auf die Atmung von Blattgeweben. *Planta* 58, 136–143 (1962).
- RAUEN, H. M.: *Biochemisches Taschenbuch. Erster Teil.* Springer-Verlag (1964).
- ROMANI, R. J. a. J. YU: Mitochondria: „Coupling“ by Cycloheximide? *Plant Physiol.* 43, Suppl. 30 (1968).
- ROSE, R. J.: The effect of Cycloheximide on cell division in partially synchronized plant cells. *Aust. Journ. of Biol. Sci.* 23, 573–583 (1970).
- ROSS, C. a. M. KRINNER: Inhibition of flowering in the cocklebur by cycloheximide. *Plant Physiol.* 42, Suppl. 42, S. 20 (1967).
- SACHS, J.: Wirkung des Lichts auf die Blütenbildung unter Vermittlung der Laubblätter. *Bot. Zeitung* 23, 117–121; 125–131; 133–139 (1865).
- SAWLMEY, S., K. L. TOKY a. K. K. NANDA: Floral induction by 2, 3, 5-Triiodobenzoic acid in *Impatiens balsamina*, a qualitative short-day plant. *Planta* 95, 277–280 (1970).
- SALISBURY, F. B. a. J. BONNER: Inhibition of photoperiodic induction by 5-fluorouracil. *Plant Physiol.* 35, 173–177 (1960).
- SCHNARRENBURGER, C. u. H. MOHR: Die Wechselwirkung von Hellrot, Dunkelrot und Blaulicht bei der Photomorphogenese von Farngametophyten (*Dryopteris filix-mas*). *Planta* 75, 114–124 (1967).
- SCHWEMMLE, B.: Das Problem der Blütenbildung. *Naturw. Rundsch.* 22, 47 bis 53 (1969).
- SCHWOCHAU, M. E. a. L. A. HADWIGER: Regulation of gene expression by Actinomycin D and other compounds which change the conformation of DNA. *Arch. of Biochem. a. Biophys.* 134, 34–41 (1969).
- SEARLE, N. E.: Physiology of flowering. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 16, 97–118 (1965).

- SEBALD, W., A. J. SCHWAB a. TH. BÜCHER: Cycloheximide resistant amino acid incorporation into mitochondrial protein from *Neurospora crassa* in vivo. *FEBS-Letters* 4, 243–246 (1969).
- SHERWOOD, S. B., J. O. EVANS a. C. ROSS: Gel electrophoresis studies of proteins from leaves of photoperiodically induced and vegetative cocklebur plants. *Plant a. Cell Physiol.* 12, 111–116 (1971).
- SHIMENO, K. a. S. KINOSHITA: Inhibitory effect of thiouracil on germination of leaf Mustard seeds and its reversal by pyrimidine derivatives. *Plant a. Cell Physiol.* 4, 145–152 (1963).
- SIEGEL, M. R. a. H. D. SISLER: Site of action of Cycloheximide in cells of *Saccharomyces pastorianus*. *Biochem. Biophys. Acta* 87, 70 (1964); 87, 83 (1964).
- STANNERS, C. P.: The effect of Cycloheximide on polyribosomes from Hamster cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 24, 758–764 (1966).
- TANADA, T.: A rapid photoreversible response of Barley root tips in the presence of 3-indoleacetic acid. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 59, 376 bis 380 (1968).
- TANNER, W. u. O. KANDLER: Die Abhängigkeit der Adaptation der Glukoseaufnahme von der oxidativen und der photosynthetischen Phosphorylierung bei *Chlorella vulgaris*. *Z. f. Pflanzenphysiol.* 58, 24–32 (1967).
- TASCA, R. J. a. N. HILLMANN: Effects of Actinomycin D and Cycloheximide on RNA and protein synthesis in cleavage stage Mouse embryos. *Nature* 225, 1022–1025 (1970).
- TELTSCHEROVA, L., F. SEIDLOVA a. J. KREKULE: Effect of some pyrimidine analogues on flowering of long-day and short-day plants. *Biol. Plant.* 9, 234–244 (1967).
- TOURNOIS, M. J.: Influence de la lumière sur la floraison du houblon japonais et du chauvre. *Comp. Rend. Acad. Sci.* 155, 297–300 (1912).
- TUPY, J.: Synthesis of protein and RNA in pollen tubes stimulated with 2-thiouracil. *Biol. Plant.* 8, 398–410 (1966).
- TUPY, J., R. G. STANLEY a. H. F. LINSKENS: Stimulation of pollen tube growth in vitro by thiouracil and other antimetabolites of nucleic acid bases. *Acta Bot. Neerl.* 14, 148–154 (1965).
- UMEMURA, K. a. Y. OOTA: Effects of nucleic- and protein-antimetabolites on frond and flower production in *Lemna gibba* G 3. *Plant a. Cell Phys.* 6, 73–85 (1965).
- VAZQUEZ, D., T. STAEHELIN, M. L. CELMA, E. BATTANER, R. FERNANDEZ-MUNOZ a. R. E. MONRO, in: *Inhibitors-Tools in cell research*. Springer-Verlag, Berlin (1969).
- WAGNER, E. u. H. MOHR: Kinetische Studien zur Interpretation der Wirkung von Sukzedanbestrahlung mit HR und DR bei der Photomorphogenese. *Planta* 70, 34–41 (1966).

- WAGNER, E. u. H. MOHR: Kinetic studies to interpret high-energetic phenomena of photomorphogenesis on the basis of phytochrom. Photochem. Photobiol. 5, 397–406 (1966).
- WALLACE, A., R. T. ASHCROFT, M. W. M. LEO a. G. A. WALLACE: Effect of Cycloheximide, Gamma Irradiation and Phosphorus deficiency on root pressure exudation in Tobacco. Plant Physiol. 45, 300–304 (1970).
- WARBURG, O. u. W. CHRISTIAN (siehe J. L. BAILEY S. 299, 1962).
- WARDELL, W. a. F. SKOOG: Flower formation in excised tobacco stem segments. II. Reversible removal of IAA inhibition by RNA base analogs. Plant Physiol. 44, 1407–1412 (1969).
- WARDLAW, C. W.: Morphogenesis in plants. London, Richard Clay (The Cancer Press) 1968.
- WELLENSIEK, S. J.: The rate of floral deblocking in *Silene armeria* L. Z. f. Pflanzenphysiol. 61/5, 462–471 (1970).
- WOODSTOCK, L. W. a. R. BROWN: Effects of 2-thiouracil on nucleic acid metabolism in roots of *Pisum sativum*. Bot. Gaz. 127, 6–11 (1966).
- YOSHIDA, K. K., K. UMEMURA, K. YOSHINAGA a. Y. OOTA: Specific RNA from photoperiodically induced cotyledons of *Pharbitis nil*. Plant a. Cell Physiol. 8, 97–108 (1967).
- YOUNG a. NAKADA: Protein component lacking after Chloramphenicol treatment. Nature 227, 604–606 (1970).
- ZEEVAART, J. A. D: Flower formation as studied by grafting. Meded. Landbouwhogeschool 58, 1–88 (1958).
- ZEEVAART, J. A. D.: DNA-multiplication as a requirement for expressions of floral stimulus in *Pharbitis nil*. Plant Physiol. 37, 296–304 (1962).
- ZENK, M. H.: Phytohormone und Genaktivität. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 83, 325 bis 344 (1970).

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Professor Dr. W. Rau durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, für die vielseitigen Anregungen und die stetige Anteilnahme an allen wissenschaftlichen und persönlichen Fragen sowie für sein großes Verständnis für meine beruflichen Belange bin ich ihm zu großem Dank verpflichtet.

Sehr herzlich bedanke ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. A. Böck für praktische Ratschläge und anregende Diskussionen. Herrn Prof. Dr. W. Tanner bin ich für teilweise Überlassung von Zählgeräten dankbar.

Frl. Gebhardt danke ich für sorgfältige und gewissenhafte technische Assistenz bei einem Teil der Versuche.

Mein Dank gilt auch dem Präparator des Instituts, Herrn Debbert, für seine Hilfe bei der Anzucht und Pflege des Pflanzenmaterials und der früheren Institutsgärtnerin Frl. Schneider für die Betreuung der Versuchspflanzen.

LEBENS LAUF

Am 9. Januar 1936 wurde ich, Siegfried Werner Klautke, als 4. Kind des damaligen Mühlenbesitzers und jetzigen Schreinermeisters Paul Klautke und seiner Ehefrau Olga, geb. Schön, in Klein-Marwitz / Kreis Pr. Holland (Ostpreußen) geboren. Im Jahre 1939 übersiedelten meine Eltern nach Kulm/Weichsel, von wo wir im Januar 1945 nach Bayreuth (Oberfr.) evakuiert wurden. Nach dem Besuch der Grundschule trat ich in die Oberrealschule für Knaben in Bayreuth (jetziges Graf-Münster-Gymnasium) über und legte dort im Juli 1957 die Reifeprüfung ab. Im WS desselben Jahres immatrikulierte ich mich an der Pädagogischen Hochschule Bayreuth der Universität Erlangen und beendete das Studium 1959 mit der I. Lehramtsprüfung für Lehrer an Volksschulen. Daran schloß sich der Vorbereitungsdienst als a. p. Lehrer an, der mit der II. Lehramtsprüfung (1962) beendet wurde. Ein Jahr später entschloß ich mich zur Aufnahme eines naturwissenschaftlichen Studiums und belegte an der Ludwig-Maximilians-Universität in München die Fächer Biologie, Chemie, Geographie. Im Mai 1965 wurde ich von der Pädagogischen Hochschule München der Universität München als wissenschaftlicher Assistent mit selbständigen Lehrverpflichtungen eingestellt, wo ich auch jetzt noch hauptberuflich tätig bin.

Im Jahre 1965 heiratete ich Frl. Veronika Ellwanger; wir haben inzwischen zwei Kinder im Alter von $2\frac{1}{2}$ und $4\frac{1}{2}$ Jahren.

Unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Rau begann ich im Herbst 1967 mit der Anfertigung vorliegender Arbeit.

